

Ana Paula D. M. Espindola

**TRITERPENÓIDES DE *Doliocarpus schottianus* Eichler E
ANÁLISE DO ÁCIDO BETULÍNICO POR
CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA**

Dissertação apresentada como requisito
parcial à obtenção do grau de Mestre.
Curso de Pós-Graduação em Química,
Setor de Ciências Exatas, Universidade
Federal do Paraná.
Orientador: Prof. Brás Heleno de Oliveira

CURITIBA

2000

TERMO DE APROVAÇÃO

TRITERPENOIDES DE *DOLIOCARPUS SCHOTTIANUS* E ANALISE DO ÁCIDO BETULÍNICO POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA

por

ANA PAULA DOMINGUES DE MELLO ESPINDOLA


Dissertação aprovada como requisito

parcial para obtenção do grau de


Mestre no Programa de Pós-Graduação em Química,

pela Comissão Examinadora composta por:

Orientador:



Prof. Dr. Brás Heleno de Oliveira
Deptº de Química – UFPR



Profª Drª Adriana Contin
Deptº de Farmácia - UFPR



Profª Drª Ana Luisa Lacava Lordello
Deptº de Química - UFPR

Curitiba, 31 de março de 2000.

I. DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Célio e Nilza;
Ao meu marido, Rodrigo;
À minha filha Georgia

Teoria é quando se sabe tudo e nada funciona. Prática é quando tudo funciona e ninguém sabe por quê. Neste recinto, conjugam-se teoria e prática: aprende-se e no final funciona.

(adaptado de um cartaz numa repartição pública em Brasília)

II. AGRADECIMENTOS

Aos Professores. Dr. Brás Heleno de Oliveira e Dr. Cid Aimbiré Moraes Santos, pela eficiente orientação em todas as etapas deste trabalho.

À todos os professores do Departamento de Farmácia pelo incentivo, sugestões e colaboração.

Aos professores do Departamento de Química pelo conhecimento transmitido.

Ao Prof. Dr. Richard Brown do Departamento de Química da Universidade de Manchester pela realização dos espectros de ressonância magnética nuclear, massa e cristalografia de raio-x.

Ao Prof. Dr. José D. S. Filho do Departamento de Química da UFMG, pela realização dos espectros de ressonância magnética nuclear.

Aos colegas do laboratório de produtos naturais, Denise, Rogério, Maria Cristina, Cristina e Paulo César, e do laboratório de Farmacognosia, Klézia, Gilson, Sílvio e Orlando, pelo apoio, discussões e idéias.

Aos colegas do Programa de Mestrado do Departamento de Química, pelo companheirismo.

Ao Marcelino, Secretário da Pós-graduação por todas as vezes que quebrou galhos, deu apoio e ajudou de muitas formas.

À amizade dos amigos Hidevaldo, Iara, Fabiano e Davi

Aos funcionários dos Departamentos de Química e Farmácia por sua espontânea colaboração.

À CAPES que propiciou o suporte financeiro para o desenvolvimento do trabalho.

À todos aqueles que de uma forma ou de outra, contribuíram para a realização deste trabalho.

III. LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- δ - deslocamento químico
- $\lambda_{\text{máx}}$ - comprimento de onda (nm) de absorção máxima
- AcOEt - Acetato de Etila
- CCD - cromatografia em camada delgada
- CCDC- cromatografia em camada delgada centrífuga
- CDCl_3 - clorofórmio deuterado
- CLAE - cromatografia líquida de alta eficiência
- CLAE-FR - cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa
- CLAE-EM - cromatografia líquida de alta eficiência com espectrômetro de massa.
- CLV - cromatografia líquida à vácuo.
- d - duplete
- DEPT – Distortionless Enhancement by Polarization Transfer
- DMSO - dimetilsulfóxido
- D-gal – D-galactose
- D-glc – D-glucose
- CLAE-FR - cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa
- EM - espectrometria de massas
- EMIE – espectrometria de massas impacto eletrônico.
- L-rha – L-ramnose
- M - multiplete
- Me – grupo metila
- OMe – Grupo metoxílico

ppm - parte por milhão

q - quarteto

R_f - razão de frente

RMN ¹³C - ressonância magnética nuclear de carbono-13

RMN ¹H - ressonância magnética nuclear de hidrogênio

s - simpleto

t – tripleto

tr – tempo de retenção

D-xyl – D-xilose

IV. SUMÁRIO

I.	DEDICATÓRIA.....	II
II.	AGRADECIMENTOS.....	IV
III.	LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	V
IV.	SUMÁRIO	VII
V.	LISTA DE FIGURAS	IX
VI.	LISTA DE ESQUEMAS.....	X
VII.	LISTA DE TABELAS.....	XI
VIII.	RESUMO	XII
IX.	ABSTRACT	XIII
1	TRITERPENÓIDES	1
1.1	OBJETIVOS.....	1
1.2	INTRODUÇÃO	1
1.2.1	<i>Terpenos</i>	1
1.2.2	<i>Triterpenóides</i>	5
1.3	MÉTODOS DE ISOLAMENTO E ANÁLISE.....	13
1.4	PROPRIEDADES BIOLÓGICAS	20
1.5	IMPORTÂNCIA COMERCIAL	24
2	TRITERPENÓIDES EM <i>DOLIOCARPUS SCHOTTIANUS</i>	27
2.1	INTRODUÇÃO	27
2.1.1	<i>A Família Dilleniaceae</i>	27
2.1.2	<i>Doliocarpus schottianus</i>	31
2.2	EXPERIMENTAL	33
2.2.1	<i>Especificação dos materiais e equipamentos</i>	33
2.2.2	<i>Material Botânico</i>	34
2.2.3	<i>Marcha sistemática fitoquímica</i>	34
2.2.4	<i>Preparação e Fracionamento do Extrato pela Metodologia 1</i>	38
2.2.5	<i>Preparação e Fracionamento do Extrato pela Metodologia 2</i>	41

2.2.6	Dados Espectrométricos dos Compostos Isolados.....	43
2.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	44
2.3.1	Identificação de Metabólitos Secundários.....	44
2.3.2	Fracionamento do Extrato Pela Metodologia 1	46
2.3.3	Fracionamento do Extrato pela Metodologia 2.....	52
2.4	CONCLUSÃO	55
2.5	ESPECTROS DE RMN	57
3	ANÁLISE DO ÁCIDO BETULÍNICO POR CLAE EM <i>DOLIOCARPUS SCHOTTIANUS</i>	77
3.1	INTRODUÇÃO	77
3.2	EXPERIMENTAL	78
3.2.1	Instrumentação	78
3.2.2	Preparo da amostra	78
3.2.3	Condições cromatográficas	79
3.2.4	Determinação e calibração.....	79
3.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	80
3.4	CONCLUSÃO	84
4	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	85

V. LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Isopentenil difosfato (I) e dimetilalil difosfato (II)	1
Figura 2 - Unidades de isopreno (III) e 2-metil-1,3-butadieno (IV)	3
Figura 3 - Esqualeno (V)	5
Figura 4 - Exemplos de saponina (VI), cardiotônico (VIII) e alcalóide estereoidal (X)	8
Figura 5 – Numeração de alguns esqueletos de triterpenóides	18
Figura 6 - Exemplo de inibidores alimentares	21
Figura 7 - Esteróides utilizados para defesa química de animais....	22
Figura 8 – Ácido ursólico - competição entre plantas superiores	23
Figura 9 – Substância química envolvida na defesa pré-infeccional	24
Figura 10 – Exemplos de triterpenóides com interesse comercial ..	26
Figura 11 - Flavonóides encontrados em Dilleniaceae.....	29
Figura 12 - Triterpenos isolados de <i>Dillenia papuana</i>	30
Figura 13 – Lignana presente em <i>Doliocarpus dentatus</i>	31
Figura 14 – Material botânico utilizado	32
Figura 15 - Fragmentos comuns a triterpenos	47
Figura 16 - Esqueletos esperados no <i>D. schottianus</i>	47
Figura 17 – Estrutura do ácido betulínico numerada	48
Figura 18 - Estereoquímica do carbono 3	49
Figura 19 – Difração de raio-x de DS-1 _{ac}	50
Figura 20 - Curva de calibração do ácido betulínico*	80
Figura 21 - Cromatograma da solução padrão de ácido betulínico *	80
Figura 22 - Cromatograma de extrato de <i>Doliocarpus schottianus</i> *	82

VI. LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1 – Via do ácido mevalônico	2
Esquema 2 – Via do MEP (LICHENTHALER <i>et al</i> , 1997b)	2
Esquema 3 - Biossíntese dos terpenos a partir do isopentenil difosfato (I) e do dimetilalil difosfato (II).....	4
Esquema 4 - Biossíntese do esqualeno	6
Esquema 5 - Conversão do esqualeno(V) em lanosterol (XIV) e cicloartenol (XV).....	9
Esquema 6 – Formação do cátion damarenila.	10
Esquema 7 - Formação de alguns esqueletos triterpênicos a partir do cátion damarenila (XVI).....	12
Esquema 8 - Formação dos hopanóides.....	13

VII. LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Deslocamento no RMN ^{13}C dos diferentes tipos de átomos de carbono (UGAZ, 1994)	17
Tabela 2 - Deslocamento químico no RMN ^{13}C dos átomos de carbono com função oxigenada (GALLEGOS, 1990).	19
Tabela 3 - Posição taxonômica da espécie, segundo Cronquist (CRONQUIST, 1987)	31
Tabela 4 - Frações do extrato clorofórmico (CLV).....	41
Tabela 5 - Pesquisa Fitoquímica no <i>Doliocarpus schottianus</i>	45
Tabela 6 –Dados espectrométricos de Ds-01 _{ac} e do ácido betulínico	49
Tabela 7 - Dados espectrométricos de 4D1	53
Tabela 8 - Dados espectrométricos de 3IC e possível atribuição....	55
Tabela 9 –Metodologia de extração	83
Tabela 10 – Replicatas do ácido betulínico	83
Tabela 11 – Doseamento do ácido betulínico	84

VIII. RESUMO

O trabalho descrito nesta dissertação refere-se ao isolamento e identificação espectroscópica de triterpenóides de *Doliocarpus schottianus*, Eichler. O fracionamento cromatográfico do caule levou ao isolamento do ácido betulínico, β -sitosterol e de uma mistura de triterpenos de esqueleto oleanano.

Foi também realizada a quantificação do principal composto isolado, o ácido betulínico, devido às suas importantes propriedades farmacológicas. Através de CLAE-FR foi realizado um estudo da distribuição deste metabólito na planta. Os maiores teores foram encontrados na casca do caule da planta e os menores nas folhas.

IX. ABSTRACT

This work describes the isolation and spectroscopical identification of some triterpenoids from *Doliocarpus schottianus*, Eichler. The chromatographic fractionation led to the isolation of betulinic acid, β -sitosterol and a mixture of triterpenoids of the oleanane type.

The quantification of the main compound isolated, betulinic acid, was also carried out due to its important pharmacological properties. Using RP-HPLC a study of the distribution of the metabolite in the plant was accomplished. The highest concentrations of betulinic acid were found in the bark and the lowest in the leaves of the plant.

1 TRITERPENÓIDES

1.1 Objetivos

Devido ao uso popular da planta como fitoterápico e devido à falta de estudos químicos da planta utilizada neste trabalho, decidiu-se iniciar seu estudo fitoquímico dirigido para os triterpenóides, metabólitos provavelmente presentes na planta.

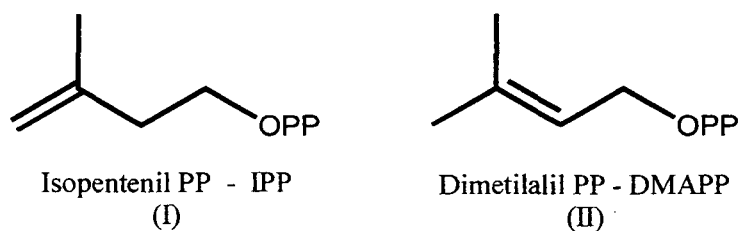
Tendo em vista as importantes propriedades farmacológicas do ácido betulínico e devido à ausência na literatura de relatos de análise de plantas da família por CLAE, foi desenvolvida uma metodologia para quantificação daquele composto em *D. schottianus*.

1.2 Introdução

1.2.1 Terpenos

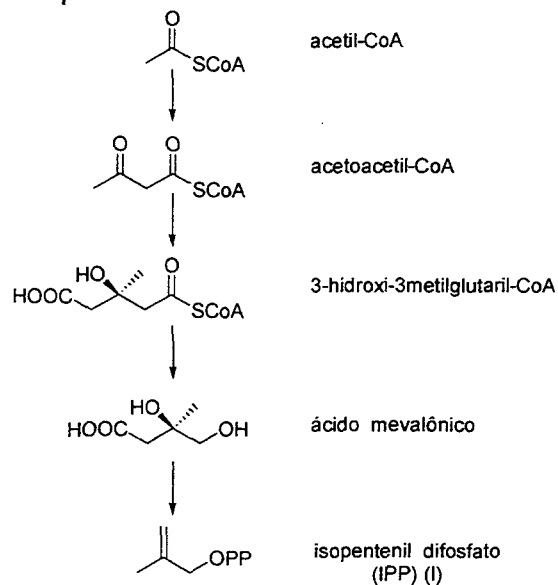
Os terpenos são uma grande família de produtos naturais que biossinteticamente são originados à partir do isopentenil difosfato (IPP) (I) e do seu isômero dimetilalil difosfato (DMAPP) (II) (Figura 1).

Figura 1 – Isopentenil difosfato (I) e dimetilalil difosfato (II)

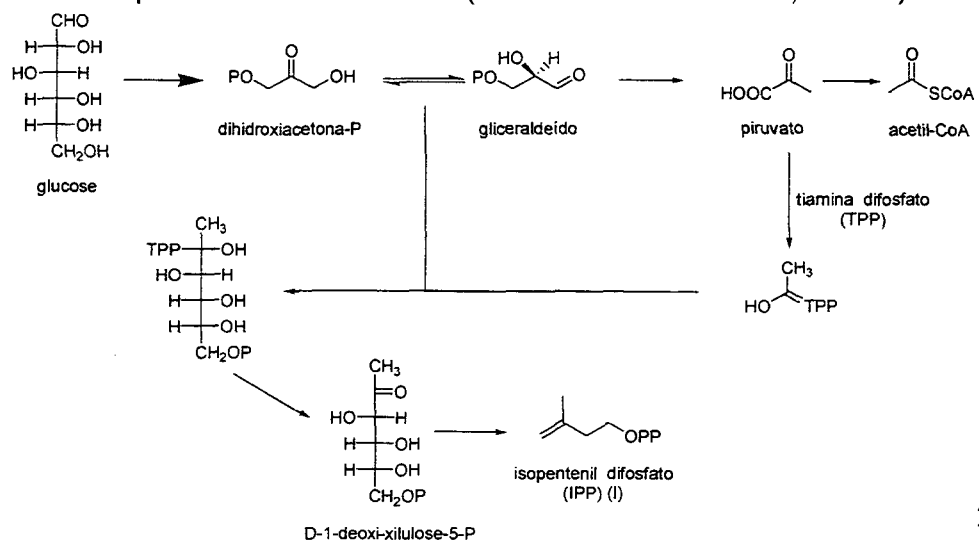


Até a publicação do trabalho de Rohmër *et al* (1993) acreditava-se que estes dois compostos fossem formados somente pela via do ácido mevalônico (MVA) (**Esquema 1**). Neste trabalho, Rohmër demonstrou que eubactérias utilizavam a via do metil eritrol fosfato (MEP) para sintetizar o isopentenil difosfato (I). Trabalhos subsequentes (ROHMER *et al* 1996; LICHTENTHALER *et al* 1997; LICHTENTHALER *et al* 1997b) demonstraram que essa via também era ativa em algas verdes e em plantas superiores.

Esquema 1 – Via do ácido mevalônico

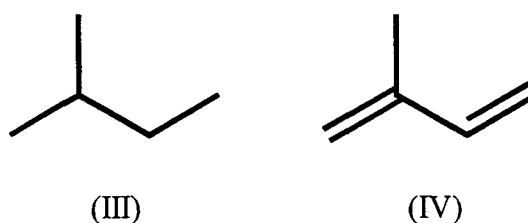


Esquema 2 – Via do MEP (LICHTENTHALER *et al*, 1997b)



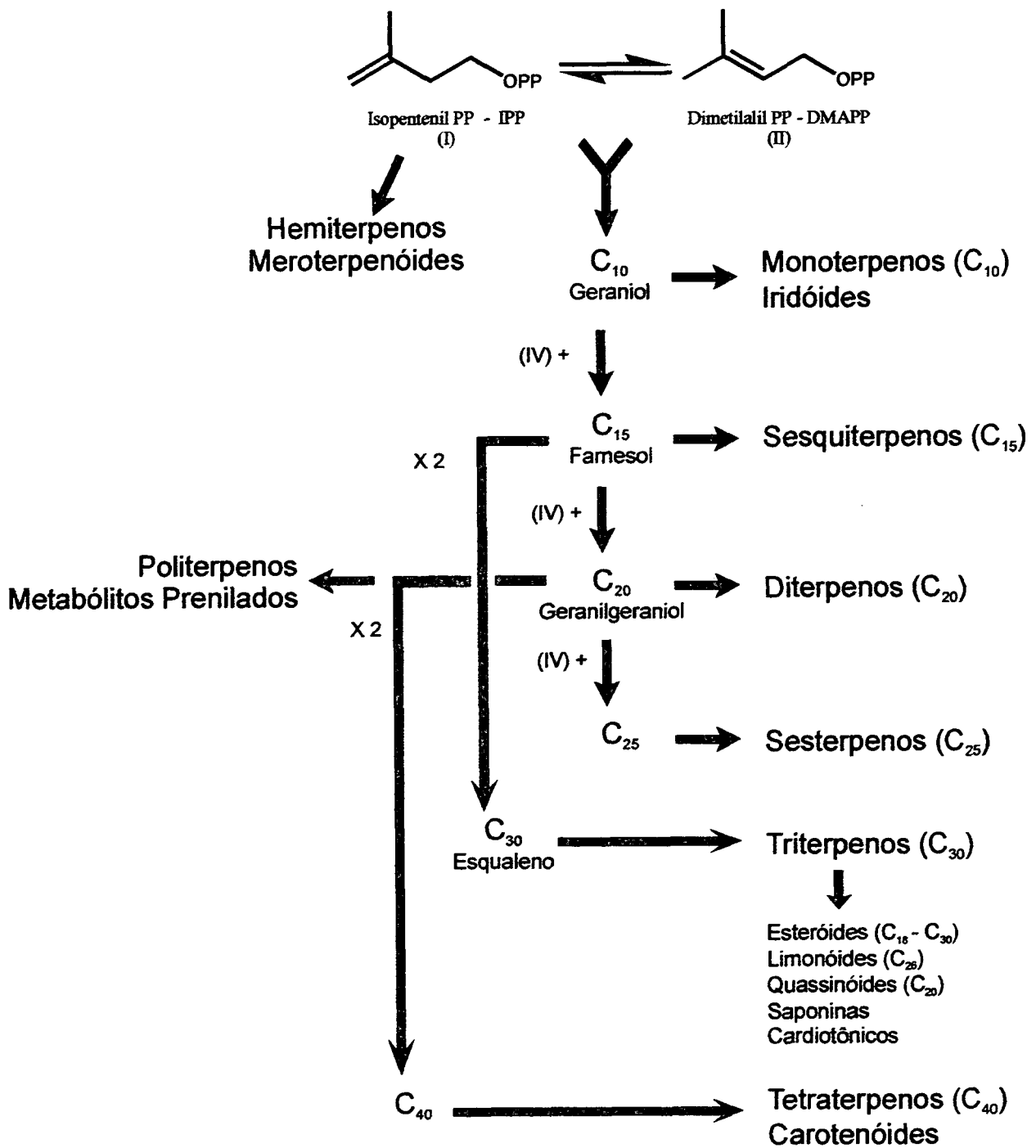
Antes dos estudos que levaram à identificação do isopentenil difosfato (I) como precursor deste grupo, acreditava-se que ele fosse formado pela união de unidades de isopreno (C_5) (III). Hoje sabe-se que, apesar do 2-metil-1,3-butadieno (IV) ser produzido pelas folhas de plantas superiores, ele não está diretamente envolvido na formação dos compostos desse grupo (Figura 2).

Figura 2 - Unidades de isopreno (III) e 2-metil-1,3-butadieno (IV)



As unidades ativas bioquimicamente (ésteres dimetilalil difosfato (DMAPP) (II) e isopentenil difosfato (IPP) (I)) unem-se em uma série de reações para a formação deste grupo. (Esquema 3) A união delas em uma seqüência cabeça-cauda, leva aos compostos lineares geraniol (C_{10}), farnesol (C_{15}), e geranilgeraniol (C_{20}), que ao sofrerem reações subseqüentes originam os monoterpenos (C_{10}), sesquiterpenos (C_{15}), diterpenos (C_{20}) e sesterpenos (C_{25}) respectivamente. Nessas moléculas, apesar das reações que sofrem, é geralmente reconhecível o arranjo cabeça-cauda. Esqualeno (C_{30}) (V) e fitoeno (C_{40}), apesar de serem formados somente por unidades de isopreno, mostram uma união cauda-cauda no centro de suas moléculas. Além de disso essas moléculas podem sofrer uma série de rearranjos, que muitas vezes dificultam a visualização direta dos precursores (MANN, 1995).

Esquema 3 - Biossíntese dos terpenos a partir do isopentenil difosfato (I) e do dimetilalil difosfato (II)

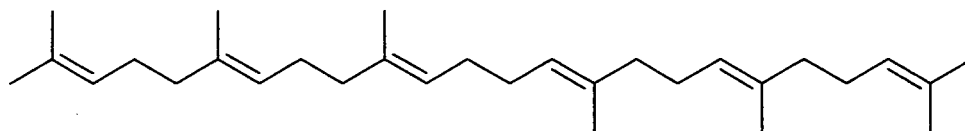


Outros produtos naturais possuem unidades de isopreno em suas moléculas, em combinação com esqueletos carbônicos derivados de outras vias. Muitos compostos fenólicos e vitaminas são exemplos disto. Um fragmento comumente encontrado nestas moléculas é o substituinte dimetilalil. Moléculas contendo esse fragmento são algumas vezes chamadas de meroterpenóides. Também é usual denominar essas moléculas como preniladas. Resíduos de cisteína de proteínas algumas vezes são alquiladas com grupos farnesila ou geranilgeranila e tendo com isso sua lipofilicidade e consequente habilidade para se associar com membranas, aumentada (BRUNETON, 1991)

1.2.2 Triterpenóides

Triterpenóides são metabólitos secundários comuns na flora e fauna terrestre e marinha, tendo como precursor o esqualeno (Figura 3). Como o nome indica, são compostos que geralmente possuem trinta carbonos. Podem ser encontrados na forma livre, ou como ésteres, éteres ou glicosídeos (MAHATO et al., 1992; MAHATO & SEN, 1997).

Figura 3 - Esqualeno (V)

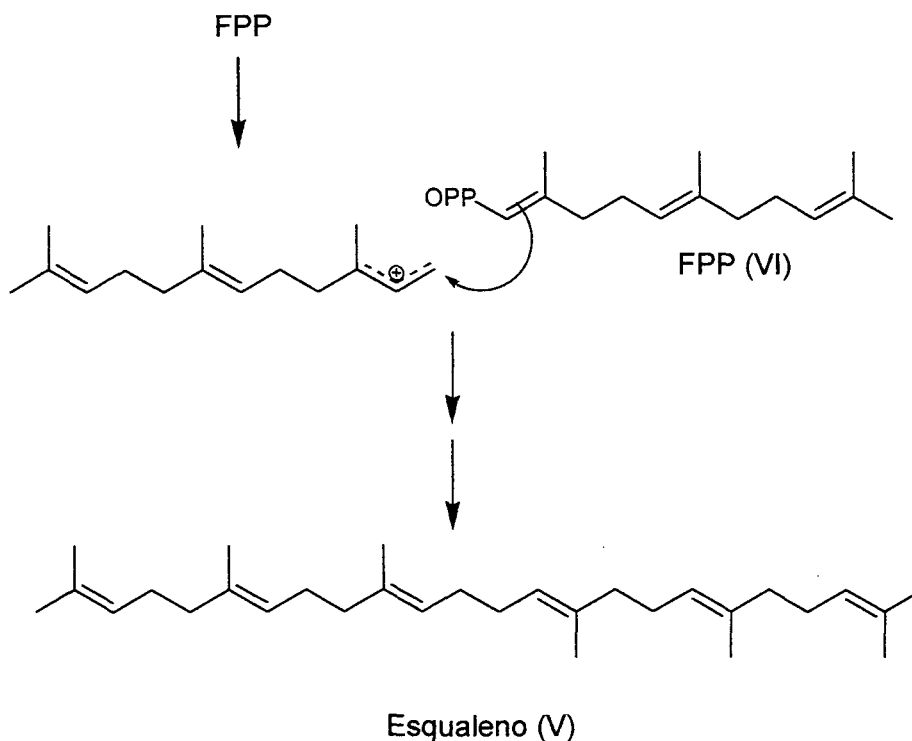


Esqualeno (V)

Diferentemente dos outros terpenos que são formados pela junção cabeça-cauda de unidades de isopreno, os triterpenóides são formados a partir da união do tipo cauda-cauda de duas moléculas de

difosfato de farnesila (FPP) (VI), levando à formação do hidrocarboneto esqualeno (V) (Esquema 4).

Esquema 4 - Biossíntese do esqualeno

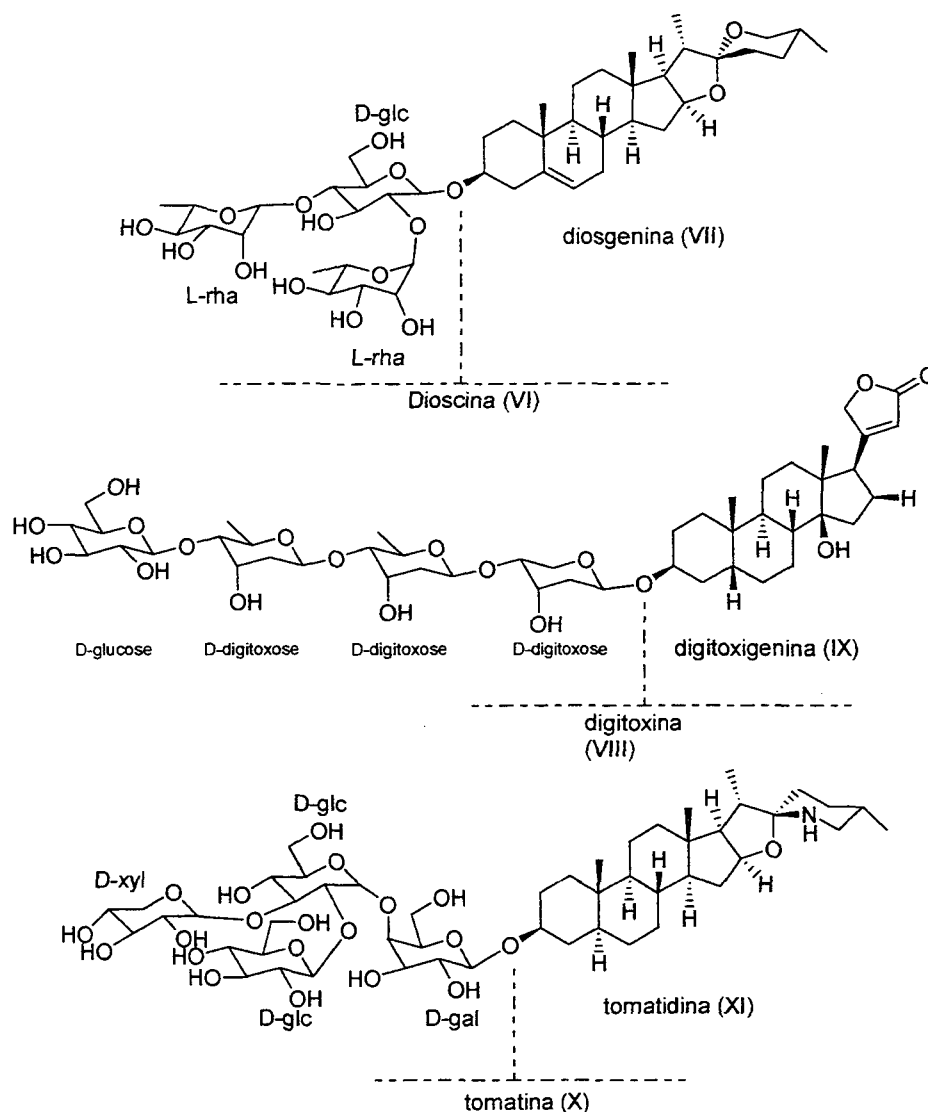


Diferentes formas de ciclização do esqualeno dão origem a esqueletos mono-, di-, tri-, tetra- ou pentacíclicos, além dos triterpenóides acíclicos, o que leva a mais de quarenta tipos de esqueletos conhecidos. Os triterpenóides pentacíclicos são os mais abundantes dentro deste grupo e por isso tem sido os mais estudados (MAHATO & KUNDU, 1994).

Pela perda de átomos de carbono do esqueleto de trinta carbonos são formados os esteróides (C₂₇), cuja importância biológica leva muitas vezes a um estudo como classe à parte, os limonóides (C₂₆), também chamados de tetranortriterpenóides e os quassinóides (C₂₀), formados pela perda de dez átomos de carbono (DEWICK, 1997).

Dois grupos de glicosídeos triterpenoídicos, os glicosídeos cardiotônicos e os glicosídeos saponosídicos, e os alcalóides esteroidais, são geralmente estudados de forma separada dos outros triterpenóides. Saponinas são glicosídeos formados a partir de triterpenóides, que mesmo em soluções diluídas, apresentam a capacidade de produzir espuma persistente, característica esta que levou ao nome do grupo já que em latim *sapo* significa sabão. Dioscina (VI), uma saponina isolada da mandioca mexicana, *Dioscorea* sp, tem sua genina diosgenina (VII) muito utilizada como precursora na síntese de hormônios esteroidais. Glicosídeos cardiotônicos ou cardioativos são substâncias que atuam diretamente no miocárdio e são compostos de três partes: porção glicosídica, contendo deoxiaçúcar, porção triterpenóide e uma lactona α,β insaturada. Digitoxina (VIII), cuja genina é a digitoxigenina (IX) é extraída da *Digitalis purpurea* e rotineiramente utilizada como medicamento no tratamento de arritmias cardíacas. Por aminação de compostos esteroidais são formados os alcalóides esteroidais. São encontrados em muitas plantas do gênero *Solanum*, como a tomatina (X) [aglicona tomatidina (XI)] encontrada no tomate *Lycopersicon esculente*, conferindo toxicidade às folhas do mesmo (EVANS, 1996; ROBBERS et al. 1997) (Figura 4).

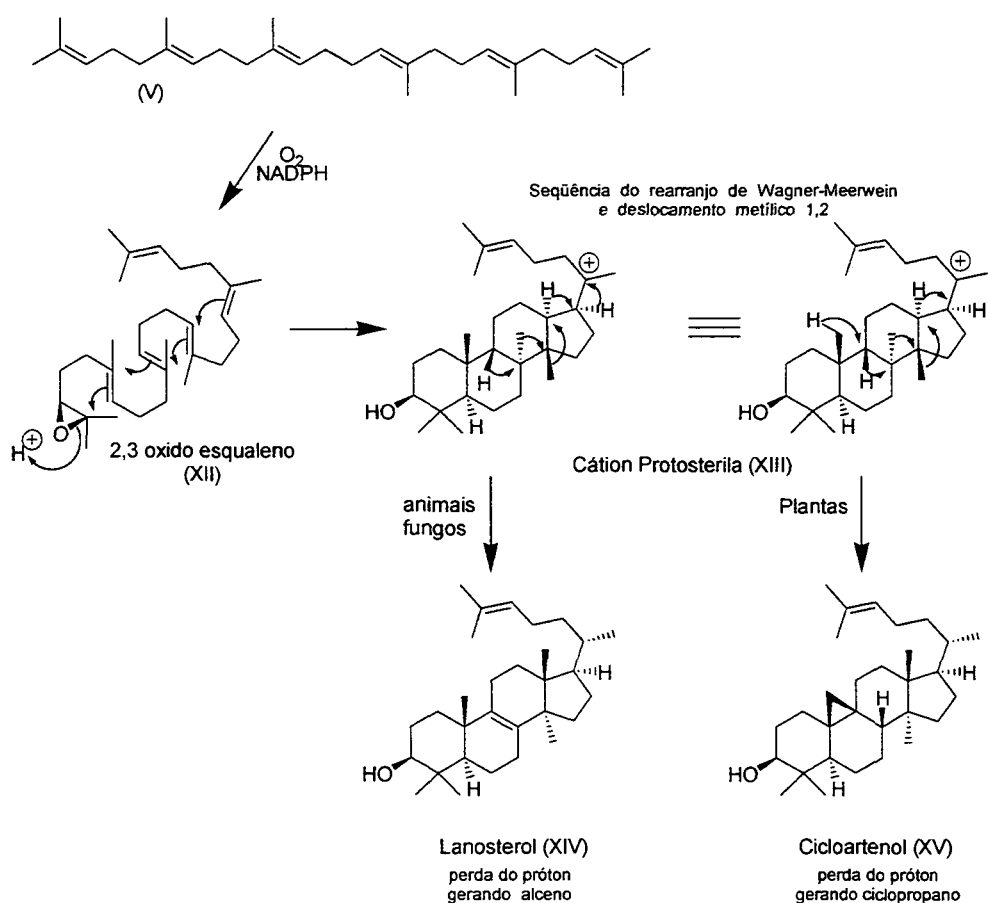
Figura 4 - Exemplos de saponina (VI), cardiotônico (VIII) e alcalóide esteroidal (X)



A conversão do esqualeno (V) em 2,3 oxido esqualeno (XII) é catalisada por flavoproteínas que utilizam O_2 e NADPH como co-fatores. A ciclização em cátion protoesterila (XIII) ocorre se o óxido esqualeno (XII) assume uma conformação cadeira-bote-cadeira-bote na superfície enzimática. A estrutura formada pode ser racionalizada como uma ciclização concertada mediada por cátions, seguida por uma série de migrações de Wagner-Meerwein de metilas e hidrogênios. A protonação

do epóxido, com a formação do carbocátion terciário preferencial, permite a adição eletrofílica à dupla ligação e formação de anel de seis membros. Este processo continua, gerando um novo carbocátion após o fechamento de cada anel, até a formação do cátion protoesterila (XIII). Essa é a via que todos os seres vivos utilizam para formação de esteróides e alguns tipos de triterpenos (Esquema 5).

Esquema 5 - Conversão do esqualeno(V) em lanosterol (XIV) e cicloartenol (XV)

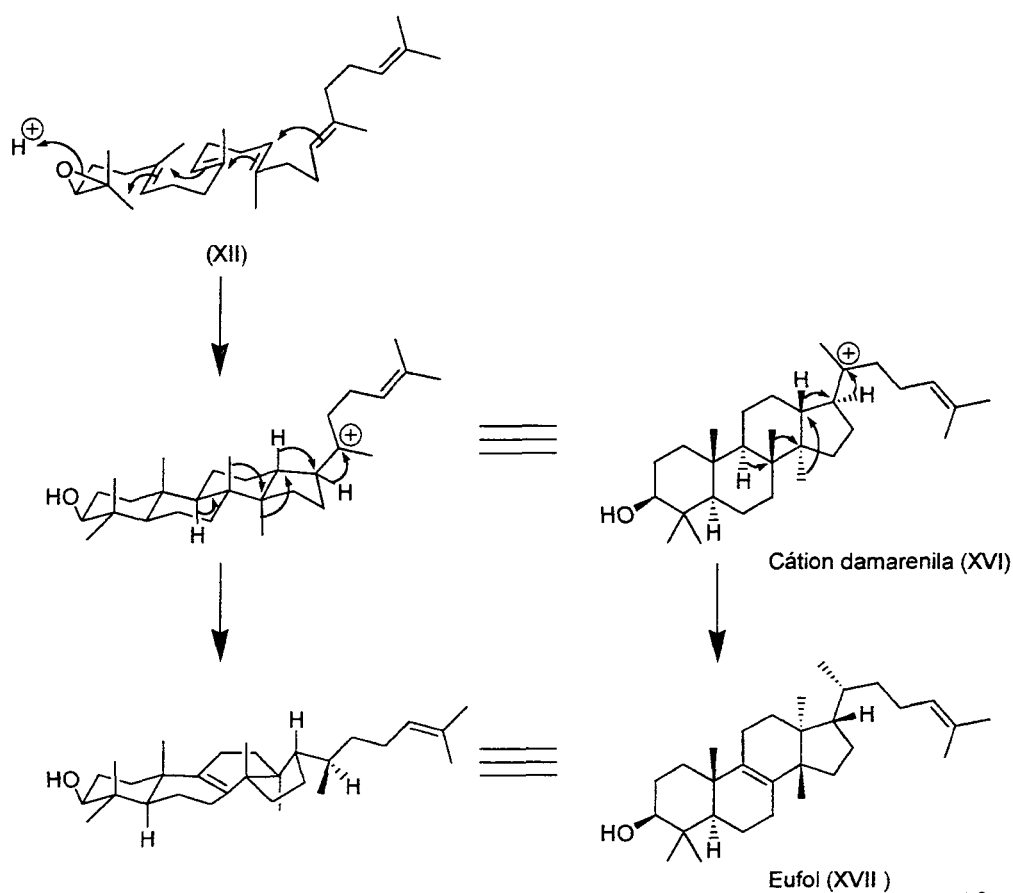


Os animais e fungos, em geral, convertem o cátion protoesterila em lanosterol (XIV), um triterpeno típico de animais, enquanto que as

plantas produzem seus triterpenóides fazendo a conversão do esqualeno em cicloartenol (XV)

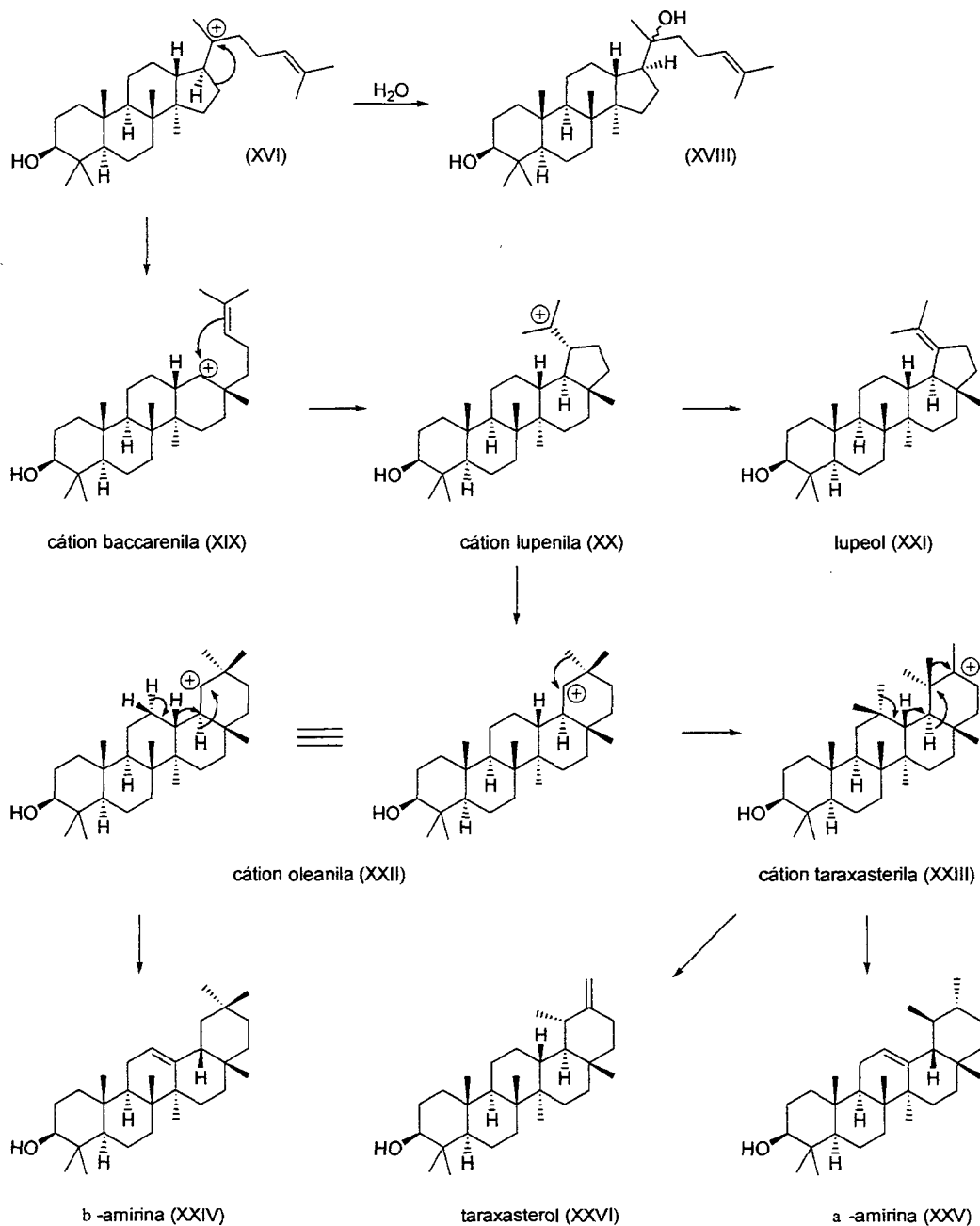
Se o óxido esqualeno (XII) assume uma conformação cadeira-cadeira-bote em outro tipo de enzima ciclase, um mecanismo de ciclização idêntico ao da formação do cátion protoesterila (XIII) leva à formação do cátion damarenila (XVI), que possui outra estereoquímica (Esquema 6). Poucas vezes ocorrem migrações de Wagner-Meerwein a partir do cátion damarenila (XVI), antes dele sofrer a ciclização, pois inverteria a estereoquímica e destruiria a conformação favorável que ele possui. O eufol (XVII), estereoisômero do lanosterol, produzido por espécies do gênero *Euphorbia*, é um dos poucos exemplos dessa migração.

Esquema 6 – Formação do cátion damarenila.



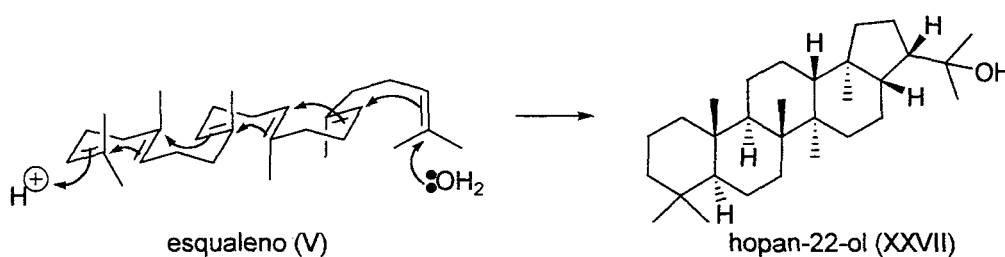
Quando rearranjos de Wagner-Meerwein não ocorrem, o cátion damarenila (XVI) pode reagir com água dando os damarenóides (XVIII), compostos epiméricos que são encontrados na resina de Dammar *Balanocarpus heimii* e no ginseng (*Panax ginseng*). Ocorrendo migração após a ciclização, chega-se a formação do cátion baccarenila (XIX), com menor tensão no ciclo por conversão do anel de cinco para seis membros, apesar da troca do carbocátion terciário por um secundário. Um sistema pentacíclico pode ser formado pela ciclização na dupla ligação, dando um novo anel de cinco membros e um carbocátion terciário no cátion lupenila (XX). A perda de um próton do cátion lupenila (XX) gera o lupeol (XXI). Expansão do anel no cátion lupenila por migração de uma ligação gera o sistema oleanil (XXII), e este por perda de um hidrogênio, forma a β -amirina (XXIV), composto amplamente distribuído no reino vegetal. A formação do isômero α -amirina (XXV) envolve primeiro uma migração de metila do cátion oleanila (XXII) e a movimentação de três hidrogênios no cátion taraxastenila (XXIII), seguido da perda de um próton. O taraxasterol (XXVI) encontrado no dente de leão (*Taraxacum officinale*), é obtido pela perda de um próton do cátion taraxastenila (XXIII). Todas estas conversões podem ser acompanhadas pelo Esquema 7.

Esquema 7 - Formação de alguns esqueletos triterpênicos a partir do cátion damarenila (XVI)



Hopanóides, encontrados em bactérias, são formados a partir do esqualeno (V) por um mecanismo de ciclização intermediado por carbocátion, mas que não envolve a epoxidação inicial do óxido esqualeno. Em vez disso, o carbocátion é formado por protonação e o composto resultante não apresenta a hidroxila na posição 3, sendo um exemplo o hopan-22-ol (XXVII), encontrado no *Alicyclobacillus acidocaldarius* (Esquema 8).

Esquema 8 - Formação dos hopanóides



Os triterpenóides podem apresentar qualquer um dos grupos funcionais oxigenados existentes, sendo muito comum a existência de mais de um grupo na mesma molécula. Alguns são compostos alifáticos totalmente saturados e muitos possuem caráter olefínico.

1.3 Métodos de Isolamento e Análise

Os triterpenóides tiveram um importante papel na desenvolvimento da “Nova Química Orgânica”. O estudo da química destes gerou vários problemas, cujas soluções levaram a teorias que agora são fundamentais na Química Orgânica. Em particular, eles proviram uma excelente base experimental para os princípios de análise conformacional, do rearranjo de Wagner-Meerwein e das diferentes

descrições de íon de carbônio não-clássico (ELIEL et al. 1965; GALLEGOS, 1990).

Embora o isolamento de muito triterpenóides date do final do século XIX, o primeiro assinalamento correto de estruturas só foi possível perto da Segunda Guerra Mundial. Assim, os compostos β -amirina (XXIV), α -amirina (XXV) e lupeol (XXI) tiveram suas estruturas corretamente formuladas em 1937, 1949 e 1951, respectivamente. (MEISELS et al. 1949; AMES et al. 1951)

Triterpenóides, de uma forma geral, podem ser separados pelos métodos comuns da química de produtos naturais, utilizando técnicas de cromatografia em coluna (CC), camada delgada (CCD), líquida de alta eficiência (CLAE), geralmente com fase normal (CLAE-FN) e fase reversa (CLAE-FR) e gasosa (CG). A simplicidade na formação de triterpenóides de esqueleto diferente mas com as mesmas funções orgânicas, como pode ser visto pelo **Esquema 7**, leva a co-ocorrência deles em um mesmo espécie. Essa característica faz com que triterpenóides diferentes apresentem o mesmo comportamento frente a diferentes técnicas cromatográficas. A extração de triterpenóides de plantas, por estes fatores, normalmente leva a misturas complexas de difícil separação e identificação (UGAZ, 1994; GALLEGOS, 1990).

Saponinas e cardiotônicos, por serem glicosídeos, e portanto polares, requerem técnicas de separação que utilizam a cromatografia em fase reversa e contracorrente, além do conhecimento de bioquímica de carboidratos, para separar os resíduos de açúcar presentes nas moléculas. A caracterização deles não é fácil, e os métodos comuns de identificação incluem hidrólise ácida seguida de caracterização da aglicona e dos resíduos de açúcar (AGRAWAL et al., 1985).

Existem uma série de reações de coloração para a detecção dos triterpenóides de uma forma geral, sendo as mais comuns a reação de

Lieberman-Buchard (amostra + gotas de ácido acético + 3mL de anidrido acético/ácido sulfúrico 50:1), a reação de Salkowsky (1 a 2mg da amostra + 1mL de ácido sulfúrico + gotas de anidrido acético), onde se observa colorações de amarelo a vermelho sangue; a reação com ácido tricloroacético, que serve para diferenciação de triterpenóides tetracíclicos e esteróides dos triterpenóides pentacíclicos, pela mudança de cores que ocorre a temperaturas diferentes (amostra + cristais de ácido tricloroacético: triterpenóides tetracíclicos e esteróides desenvolvem coloração à 60° C, enquanto os pentacíclicos desenvolvem à 110°C); a reação de Noller e a reação com ácido fosfomolibdico (UGAZ, 1994).

Para a detecção dos glicosídeos cardiotônicos são utilizadas as reações de Keller-Kiliani, Pesez e Kedde. Cada uma delas reage com uma determinada porção da molécula do glicosídeos. A reação de Keller-Kiliani verifica a presença de deoxiaçúcar na extremidade glicídica. A reação de Pesez atua na porção triterpenoídica da molécula, e a reação de Kedde no anel lactônico pentacíclico insaturado, que ao ser dissociado em meio alcalino se une a um reagente nitrado. Para os glicosídeos saponosídicos, pode-se fazer detecção por agitação, onde observa-se a presença de espuma persistente por mais de 15 minutos e a detecção por hemólise. A amostra a ser analisada é colocada em uma placa de agar sangue e observa-se se há formação de halo de hemólise (CAETANO, 1996; COSTA, 1978; UGAZ, 1994).

Como agentes cromogênicos para detecção em CCD são freqüentes os reativos de Carr Price (SbCl_3 a 20% em CHCl_3), Liebermann Buchard (1mL de H_2SO_4 + 20mL de Ac_2O + 50mL de CHCl_3 , ou 10% de Ac_2O + 10% de H_2SO_4 em etanol absoluto), cloreto de zinco (30g de ZnCl_2 em 100mL de MeOH), solução 10% de ácido fosfomolibdico e solução de H_2SO_4 a 50%. Em todos os casos o

aquecimento da placa cromatográfica leva ao desenvolvimento de coloração. As saponinas podem ser melhor detectadas pela utilização de ágar sangue (STAHL et al. 1975; UGAZ, 1994).

A identificação dos triterpenóides, propriamente dita, é feita utilizando-se de técnicas espectrométricas e determinação de constantes físicas. Durante muito tempo a utilização da análise dos espectros de massa foi a principal forma de identificação dos diversos tipos de triterpenóides, mas essa técnica pode levar a dúvidas, já que no caso de compostos análogos, os espectros são muito semelhantes, diferindo em alguns casos apenas levemente na intensidade relativa dos picos (BUDZIKIEWICZ et al. 1963).

Compostos triterpenóides mostram no espectro de infravermelho sinais a $3650-3590\text{ cm}^{-1}$ correspondentes à hidroxila secundária, sinais intensos a $2960-2850\text{ cm}^{-1}$ e $1485-1445\text{ cm}^{-1}$ correspondendo à deformações axiais de $-\text{CH}-$ e angulares de $-\text{CH}_2-$. Insaturações podem ser observadas a $3040-3100\text{ cm}^{-1}$ correspondendo à deformação axial $=\text{C}-\text{H}$ e a $1680-1620\text{ cm}^{-1}$ as deformações de $\text{C}=\text{C}$. Nos ácidos carboxílicos onde o grupo $-\text{COOH}$ está rodeado de grupos volumosos, estes se encontram na forma de monômeros e absorvem a $1678-1690\text{ cm}^{-1}$ com sinais adicionais a 3620 cm^{-1} ; se o ácido se encontra na forma de dímero a absorção localiza-se a 1742 a 1745 cm^{-1} (UGAZ, 1994).

O espectro de RMN ^1H de triterpenóides é muito característico. A região de 3 a 1 ppm sempre contém sinais intensos originados dos grupos metila e metilênicos. Entre 1,20 e 0,70 ppm se encontram os sinais para os hidrogênios das metilas (simpletos a 0,73 e 1,20 ppm para metilas em C-18 e C19 e dubletes a 0,89 e 0,87 ppm para metilas em C-21 e C-26 nos triterpenóides tetra e pentacíclicos as metilas em C-4 originam simpletos entre 0,8 e 0,9 ppm. A hidroxila na posição 3 produz

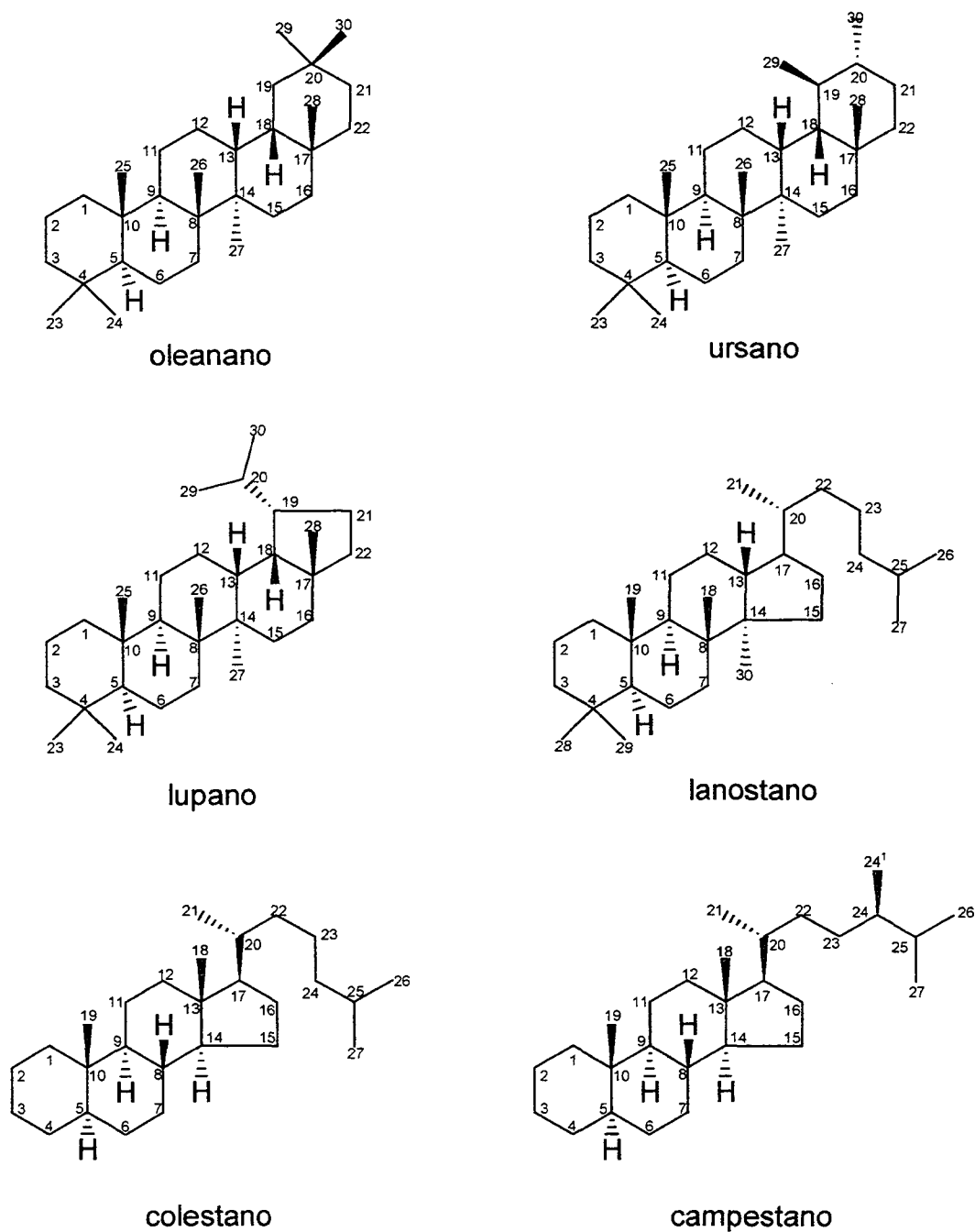
multiplete em 3,5 ppm. No espectro de RMN ^{13}C , os diferentes tipos de carbono podem ser encontrados nas regiões mostradas na Tabela 1.

Pela Figura 5 pode-se acompanhar a numeração de alguns dos principais esqueletos triterpenoídicos, sendo os esqueletos oleanano, ursano e lupano exemplos de triterpenóides pentacíclicos, lanostano, de triterpenóide tetracíclico e colestano e campestano, de esteróide.

Tabela 1 – Deslocamento no RMN ^{13}C dos diferentes tipos de átomos de carbono (UGAZ, 1994)

Tipo de Carbono	Região do espectro (ppm)
C primário	12-24
C secundário	20-41
C terciário	35-57
C quaternário	27-43
C contendo hidroxila	65-91
C olefínico	119-172
C carbonílico	177-220

Figura 5 – Numeração de alguns esqueletos de triterpenóides



Devido à semelhança estrutural entre os vários tipos de triterpenóides, muitas vezes torna-se bastante difícil o seu isolamento. Por isso foram desenvolvidos métodos para caracterização de misturas de triterpenóides, que são frequentemente obtidas durante

fracionamentos cromatográficos. A metodologia proposta por Gallegos (1990), baseada na análise de espectros de RMN ^{13}C da mistura de triterpenóides, leva a uma identificação bastante precisa dos constituintes de amostras complexas. Segundo este método, observa-se no espectro desacoplado de RMN ^{13}C as funções orgânicas presentes na amostra pela presença de deslocamentos químicos padrões (δ), como se pode observar na Tabela 2. Em seguida, no mesmo espectro observa-se a abundância relativa dos triterpenóides da mistura (quando for o caso), o número de triterpenóides e os δ das insaturações presentes na mistura. Com os sinais das insaturações consegue-se ter uma idéia do esqueleto presente na amostra, pois cada par de sinal apresenta um deslocamento característico. Em seguida obtêm-se espectros de DEPT 135 e 90 da amostra. Estes espectros informarão a respeito da multiplicidade dos átomos de carbono presentes na amostra. A terceira etapa é a partir dos dados obtidos fazer a atribuição dos sinais, utilizando tabelas da literatura.

Tabela 2 - Deslocamento químico no RMN ^{13}C dos átomos de carbono com função oxigenada (GALLEGOS, 1990).

Carbono tipo	δ em ppm
C(3)-OH (α)	76,1 6 0,5
C(3)-OH (β)	78,6 6 0,5
C(3)-O-Ac (β)	80,6 6 0,4
<u>C</u> (3)-O-CH ₃ (β)	88,7 6 0,1
C(3)-O- <u>C</u> H ₃ (β)	57,5 6 0,1
C(3)-O ₂ - <u>C</u> -CH ₃ (β)	170,6 6 0,3
C(3)-O ₂ -C- <u>C</u> H ₃ (β)	21,2 6 0,2
C(3)=O (β)	216,8 6 1,2
C(26)-O ₂ H	171,9 6 1,0 (tetracíclico)
C(28)-O ₂ H	181,1 6 2,3 (pentacíclico)
<u>C</u> (28)-O ₂ CH ₃	177,3 6 0,8
C(28)-O ₂ <u>C</u> H ₃	51,4 6 0,2

1.4 Propriedades Biológicas

A importância dos triterpenóides pode ser vista sob dois aspectos: em termos de ecologia química, ou seja seu papel nas inter-relações presentes nos ecossistemas e em termos farmacológicos, com potencial para serem utilizados pela indústria farmacêutica.

A importância dos esteróides é reconhecida há muitos anos, bem como sua presença na maioria dos organismos vivos. Somente algumas bactérias conseguem se desenvolver sem eles e, mesmo assim, utilizam os hopanóides (Esquema 8, página 13). Os hopanóides, freqüentemente encontrados em membranas bacterianas, são triterpenóides que parecem desempenhar a mesma função dos esteróides encontrados nas membranas dos organismos superiores, ou seja, manter a integridade estrutural e controlar a permeabilidade celular.

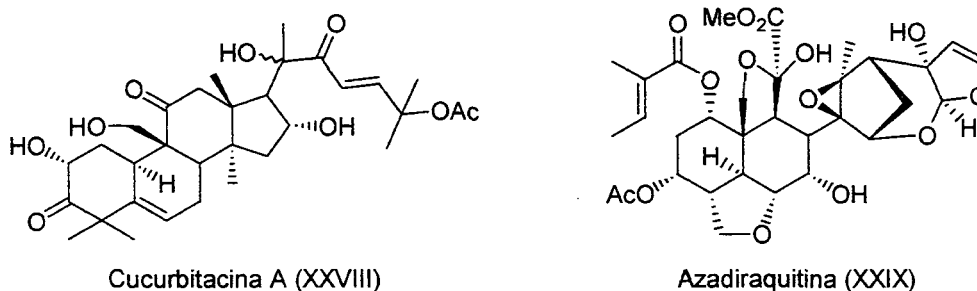
O reino animal elabora seus esteróides a partir da via do mevalonato, levando ao lanosterol e colesterol (Esquema 5, página 9). Espécies que não podem sintetizá-los por essa via (caso de insetos e crustáceos em particular), obtêm-nos a partir de fitoesteróis presentes na alimentação (BRUNETON, 1991). Já no caso dos triterpenóides pentacíclicos e glicosídeos saponosídicos e cardiotônicos, até pouco tempo não se tinha uma idéia do papel deles na natureza. Hoje, com o advento da ecologia química ou bioquímica, já tem-se algumas funções associadas a eles, entre as quais pode-se citar como atratores ou inibidores alimentares para insetos, substâncias de defesa de plantas e insetos, interação bioquímica entre plantas superiores, mecanismo de defesa pre-infeccional de plantas, além de toda a atividade hormonal em animais. (HARBONE, 1993)

As cucurbitacinas (XXVIII), uma série de vinte triterpenos tetracíclicos, são encontradas no pepino e outros membros da família

Cucurbitaceae. Elas são, provavelmente, os triterpenóides existentes mais amargos e desagradáveis ao paladar. Besouros *Phyllotreta nemorum* evitam se alimentar de plantas que possuam estas substâncias, como a *Iberis amara*. Já para a espécie *Diabrotica undecimpunctata*, que ataca a melancia (*Citrullus lanatus*) eles atuam como atratores.

Outro exemplo de inibidor alimentar é a azadiraquitina (XXIX), provavelmente um dos mais complexos limonóides encontrados. Este material é extraído comercialmente das sementes de *Azadirachta indica*, uma árvore africana, para ser utilizado como pesticida na prevenção do ataque de culturas por insetos, por ser eficiente, relativamente barato e possuir um apelo ecologicamente correto. Sua descoberta foi através da observação que os gafanhotos do deserto nunca se alimentavam dessa árvore (Figura 6) (DEWICK, 1997; HARBONE, 1993).

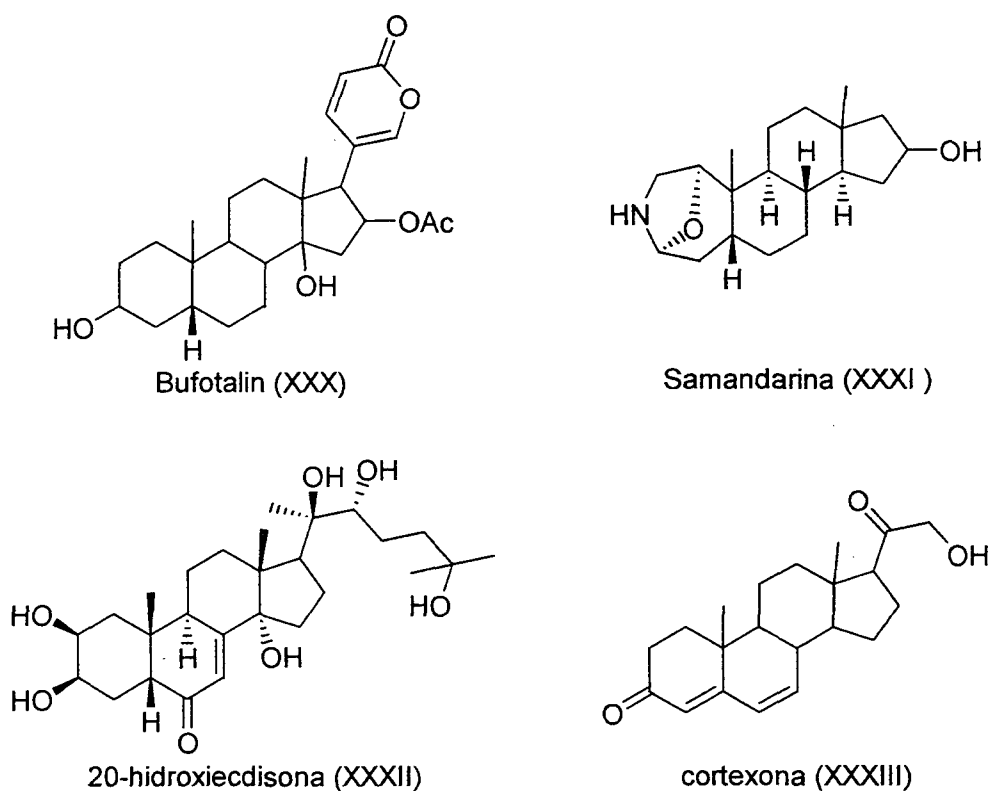
Figura 6 - Exemplo de inibidores alimentares



Os glicosídeos cardiotônicos podem funcionar como meios de defesa química contra predadores. Eles são utilizados por répteis (sapos, rãs e salamandras) e insetos (mariposas, borboletas e besouros). As bufogeninas, toxinas esteroidais que atuam no coração dos vertebrados, são utilizadas pelos sapos e rãs como agentes de defesa. A bufotalina (XXX), por exemplo, é a bufogenina produzida pelo sapo comum, *Bufo vulgaris*. Com uma estrutura diferente, mas ainda de origem esteroidal

tem-se a neurotoxina samandarina (XXXI), presente na secreção defensiva da salamandra (HARBONE, 1993).

Figura 7 - Esteróides utilizados para defesa química de animais

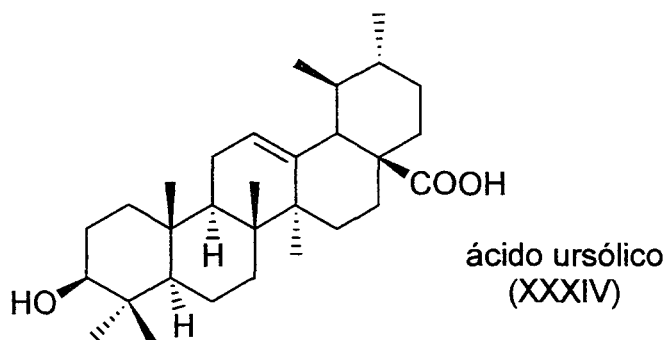


Algumas plantas produzem fitoecdisonas (exemplo, 20-hidroxiecdisona (XXXII)), hormônios de troca de insetos produzidos por vegetais, que podem interferir com a metamorfose do inseto e com isso são potencialmente perigosos para eles. Numerosas fontes de compostos esteroidais como defesa química têm sido encontradas na subfamília dos besouros d'água. Estes besouros armazenam suas toxinas como um leite venenoso em suas glândulas. A atividade tóxica só é sentida pelos predadores após a ingestão de um destes insetos. As toxinas são do tipo pregnanas e mais de 15 já foram identificadas. Cada

besouro d'água da espécie *Cybister limbatus*, contém ao menos 1mg de cortexona (XXXIII) (Figura 7) (HARBONE, 1993).

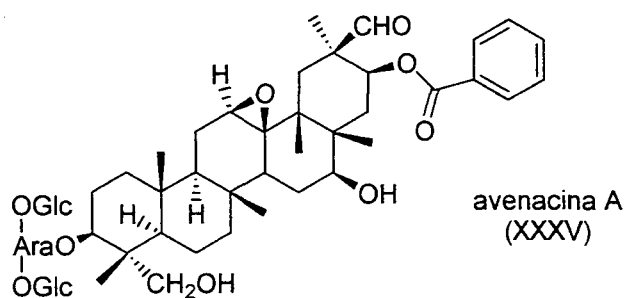
Para sobreviver, plantas superiores competem entre si por luz, umidade e nutrientes do solo no ecossistema. Para melhor sobreviverem elas desenvolveram uma série de meios para se defender de suas vizinhas, sendo muitos deles meios químicos. O ácido ursólico (XXXIV) não atua diretamente na defesa contra as plantas vizinhas e sim aumentando ajudando na absorção de terpenos que agem nessa competição entre plantas que crescem em um mesmo local, sendo um bom exemplo disso o chaparral californiano (Figura 8) (HARBONE, 1993).

Figura 8 – Ácido ursólico - competição entre plantas superiores



As plantas produzem uma série de armas químicas para impedir o ataque microbiano. A resistência da aveia (*Avena sativa*) aos fungos *Gaeumannomyces graminis*, é feita por uma série de triterpenos pentacíclicos glicosilados onde a avenacina A1 (XXXV) é típica (Figura 9). (HARBONE, 1993)

Figura 9 – Substância química envolvida na defesa pré-infeccional



1.5 Importância Comercial

Existe hoje na literatura um grande número de trabalhos associando atividades farmacológicas de plantas medicinais a triterpenóides. Entre essas atividades pode-se citar: antitumorais (BRUNETON, 1991), hipoglicemiante (MARLES & FARNSWORTH, 1995), anti-inflamatórios (SAFAYHI et al. 1997) e antiviral (VLIETNICK et al. 1997), entre outras.

Os glicosídeos cardiotônicos, compostos que apresentam uma grande especificidade pelo miocárdio e uma poderosa ação sobre ele, por sua complexidade estrutural não puderam ser sintetizados de forma a tornar economicamente viável sua substituição por produtos sintéticos. Historicamente foram muito utilizados como veneno para flechas como, por exemplo, o extrato de *Strophantus*. A descoberta do efeito cardioativo da *Digitalis* foi feita como resultado do seu uso como tratamento para gota, uma doença caracterizada pelo acúmulo de água no organismo. *Digitalis* aliviava a doença indiretamente por seu efeito no coração, aumentando o fluxo de sangue para os rins e assim, removendo o excesso de fluido do corpo. Um dos seus princípios ativos é digitoxigenina (IX) mostrada na Figura 4, página 8.

Os glicosídeos saponosídicos (saponinas) são substâncias formadoras de soluções coloidais, que quando agitadas, geram espuma e por isso são utilizadas pela indústria de alimentos. São substâncias que destroem as hemácias (hemólise). Após a hidrólise liberam agliconas conhecidas como sapogeninas, que são muito utilizadas como precursoras para a síntese de hormônios esteroidais (anticoncepcionais, antiinflamatórios e anabolizantes) (BRUNETON, 1991).

Numerosas drogas contendo triterpenóides como princípios ativos são utilizadas pela medicina atual. Pode-se citar o alcaçuz (*Glycyrrhiza glabra*), droga com propriedades calmantes e expectorantes, também muito utilizado como edulcorante em cervejas, fumo e doces. Seu princípio ativo, glicirrizina é uma mistura de sais de potássio e sódio do ácido glicirízico (XXXVI), uma saponina 50 a 150 vezes mais doce que o açúcar. Recentemente a glicirrizina foi reconhecida por possuir atividade como antiinflamatório e mineralocorticóide e por isso tem sido utilizada no tratamento de artrite reumatóide e doença de Addison (DEWICK, 1997).

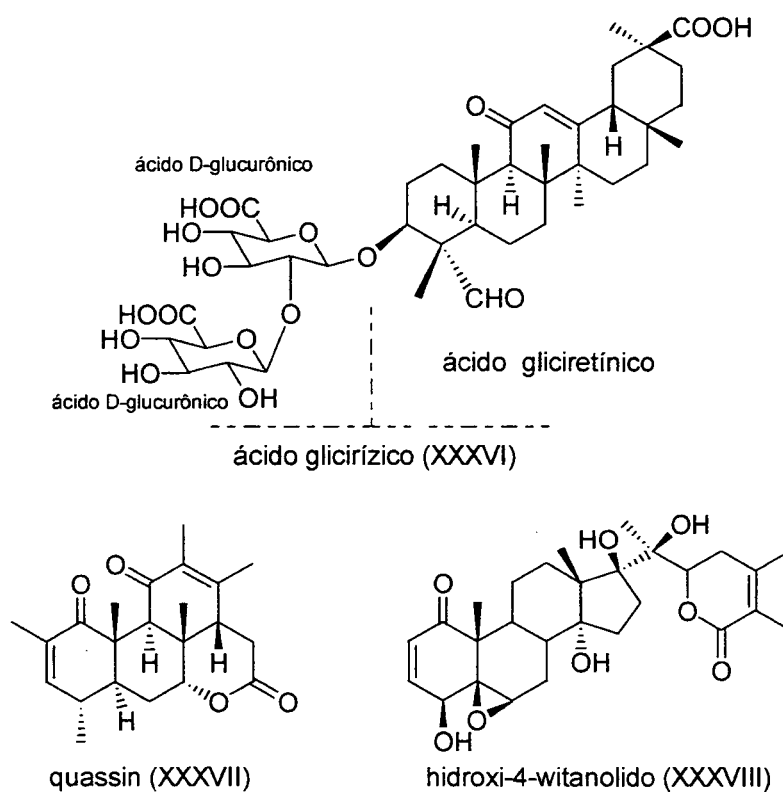
A casca de quilaia, ou casca de sabão, é retirada da árvore peruana *Quilaja saponaria*. Dela é obtida uma mistura de saponinas, conhecidas como saponina comercial, que é utilizada por suas propriedades surfactantes. Ocasionalmente é utilizada pela indústria farmacêutica na forma de tintura, em preparações como um agente emulsificante de gorduras resinas e óleos voláteis.

O Ginseng (*Panax quinquefolius* e *Panax ginseng*) é considerado como tendo propriedades tônicas, estimulantes, diuréticas e carminativas. Possui ainda atividade adaptogênica. Seus princípios ativos são uma mistura de saponinas conhecidas como ginsenosídeos, panaxosídeos e chikusetsussaponinas. (ROBBERS et al. 1997)

Além das saponinas e cardiotônicos, poucos esteróides têm interesse na terapêutica. Alguns apresentam atividade potencial e tem sido estudados para avaliar a viabilidade da sua utilização comercial. Os quassinóides, por exemplo, são importantes compostos produzidos por muitas plantas da família Simaroubaceae, em particular no gênero *Quassia*. Quassin (XXXVII) obtido da *Q. amara*, tem atraído muitos estudos por suas propriedades como citotóxico, antimalárico e amebicida. (DEWICK, 1997)

Os witanolidos, lactonas esteroídicas da *Withania somnifera*, planta hipnótica e sedativa da medicina ayurvédica, tem mostrado, tanto em ensaios *in-vivo* quanto *in-vitro*, atividade antimitóticas e algumas já se encontram em estudos pré-clínicos. Um exemplo é o hidroxí-4 witanolido E (XXXVIII) (BRUNETON, 1991) Alguns desses triterpenóides com interesse comercial se encontram na Figura 10.

Figura 10 – Exemplos de triterpenóides com interesse comercial



2 TRITERPENÓIDES EM *Doliocarpus schottianus*.

2.1 Introdução

2.1.1 A Família Dilleniaceae

Os membros da família Dilleniaceae são árvores, arbustos e cipós, que se desenvolvem em regiões de clima tropical e subtropical. São plantas relativamente primitivas e as mais desenvolvidas estão presentes na região australiana. A família possui dez gêneros e cerca de 350 espécies. Seus gêneros principais são *Dillenia*, *Doliocarpus*, *Hibbertia* e *Tetracera* (CRONQUIST, 1987).

O caule dessas plantas geralmente contém ráfides e cristais de areia no tecido parenquimatoso, sempre em longos tubos ou sacos.; crescimento secundário anômalo do tipo concêntrico (produzindo um floema interxilemático) presente em algumas espécies. O lenho apresenta vasos escalariformes. Possuem folhas alternadas raramente opostas, simples, inteiras ou dentadas, que normalmente possuem a epiderme silificada. Os estômatos mais comuns são do tipo anomocíticos. Em todos esses aspectos botânicos, as plantas da família Dilleniaceae lembram as de Magnoliidae (MABBERLEY, 1981).

Ocorrem espontaneamente no Brasil as espécies do gênero *Davilla*, conhecidas como lixinha e cipó-caboclo e *Curatella* (lixeira, sambaíba) nos campos cerrados e no Nordeste. Nessa região ocorrem ainda representantes do gênero *Tetracera*. Na Floresta Atlântica do Sul e Sudeste encontram-se espécies do gênero *Doliocarpus*. Espécies do gênero *Dillenia* encontram-se em fazendas antigas e parques, como planta cultivada (proveniente da Índia) (JOLY, 1985).

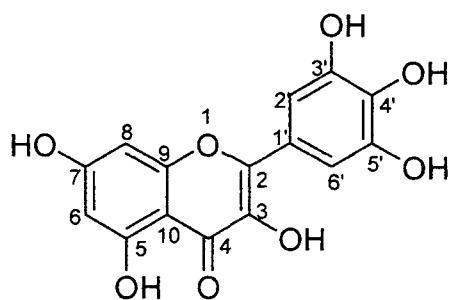
Foram encontrados apenas treze trabalhos no Chemical Abstract sobre essa família. Um deles (HARBONE, 1968), trata de uma revisão

sobre quimiotaxonomia e classes de produtos naturais encontradas em várias famílias, incluindo a Dilleniaceae. Cronquist (1978), analisa em seu trabalho a correlação entre repelentes endógenos de insetos com a taxonomia de angiospermas, comentando sobre a Dilleniaceae entre outras.

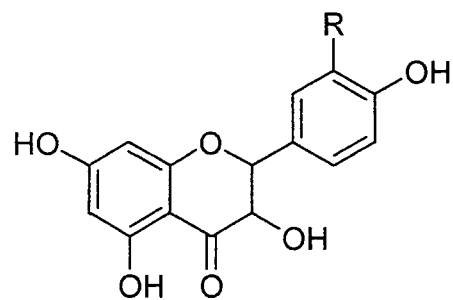
Três estudos trataram sobre a distribuição de flavonóides dentro da família Dilleniaceae. No primeiro (KUBITZKI, 1969), foram estudadas amostras de folhas de 107 espécies pertencentes a 8 gêneros. Nestes foram só estudados os flavonóides livres presentes na família. *Davilla*, *Curatella*, *Doliocarpus* e *Hibertia* contém miricetina (XXXIX), quercetina (XL) ou ambos e kaempferol.(XLI) Miricetina é raro nos gêneros *Tetracera* e *Dillenia*, onde geralmente ocorrem flavonóides metilados. Ambos os gêneros contém ramnetina (XLII) e isoramnetina (XLIII). Azaleactina e ramnocitrina estão presentes no gênero *Tetracera* e kaempferide (XLIV), no gênero *Dillenia* (Figura 11). Todas as espécies estudadas contém leucoantocianinas. A presença de flavonóides triidroxilados e não metilados é considerada uma característica primitiva. Nos dois trabalhos publicados em 1981 por Alberto Gurni, foram estudados principalmente os flavonóides glicosilados. Um total de 248 amostras, cobrindo 60 espécies de 8 gêneros foram investigadas. Miricetina 3,7,3'4' tetrametil eter foi isolada de *Doliocarpus amazonicus* subsp. *duckeanus*. Embora miricetina ocorra freqüentemente na família, não foi detectado seu tetrametil éter em mais nenhuma espécie.

Onze flavonóides sulfatados foram isolados da família Dilleniaceae. Estes são, junto com os glicosilados, os únicos flavonóides solúveis em água. Nesses compostos, os grupos sulfato estão ligados às hidroxilas fenólicas ou aos açúcares presentes (MARKHAM, 1982).

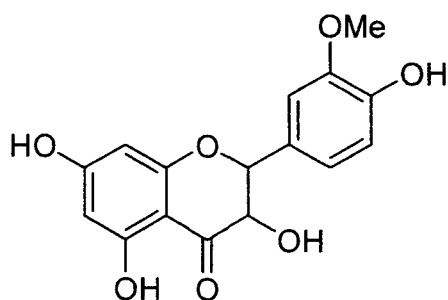
Figura 11 - Flavonóides encontrados em Dilleniaceae



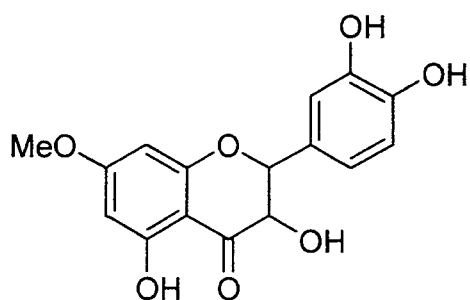
Miricetina (XXXIX)



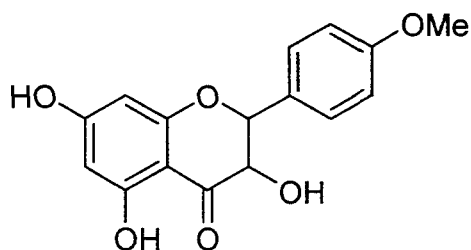
R = H, kaempferol (XLI)
R = OH, quercetina (XL)



isoramnetina (XLIII)



ramnetina (XLII)

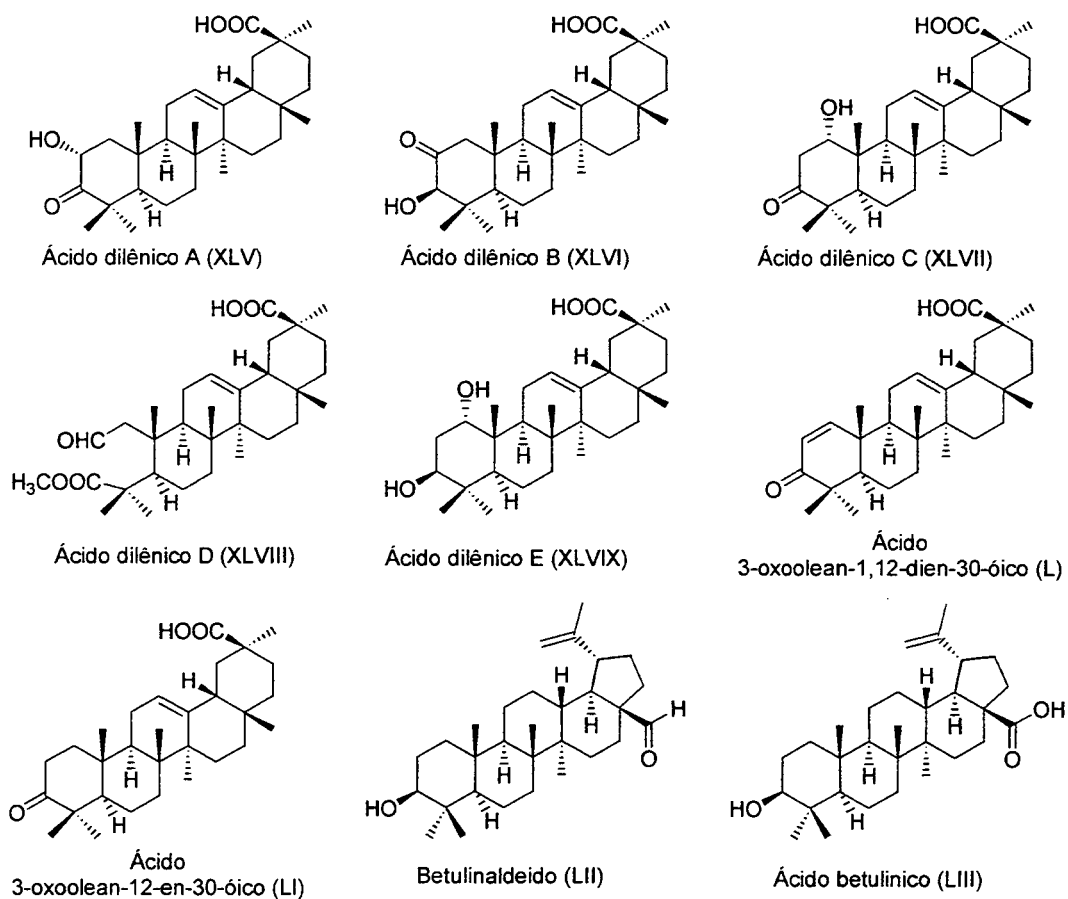


kaempferide (XLIV)

Em dois trabalhos, André Nick (NICK et al. 1994; 1995) descreveu o isolamento, identificação e atividade antibacteriana de triterpenóides isolados de *Dillenia papuana*. O fracionamento guiado por atividade biológica, levou ao isolamento dos ácidos dilênicos A, B e C, D e E e dos ácidos 3-oxoolean-1,12-dien-30-óico e 3-oxoolean-12-en-30-

óico, além dos já conhecidos betulinaldeído e ácido betulínico (Figura 12).

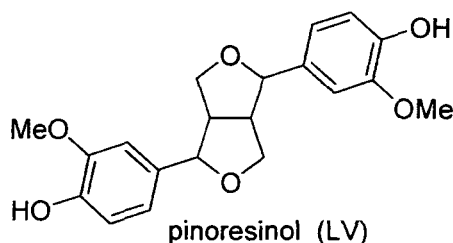
Figura 12 - Triterpenos isolados de *Dillenia papuana*



Ainda foram encontrados outros dois trabalhos tratando do isolamento de triterpenóides de plantas do gênero *Doliocarpus*: Michel Sauvain e colaboradores (SAUVAIN et al. 1996), isolaram triterpenos e lignanas com ação leishmanicida a partir de *D. dentatus*, coletado na floresta amazônica boliviana. Os terpenos obtidos por isolamento guiado por ensaio farmacológico, foram o ácido betulínico (LIII) e o betulinaldeído (LII). As lignanas foram identificadas como sendo pinioresinol (LIV), medioresinol e liriioresinol B (Figura 13).

Hao Sun e colaboradores (1996), isolaram ácido betulínico a partir de *D. verruculosus*, obtido nas Guianas, com ação de inibição de metaloproteinases (como collagenases).

Figura 13 – Lignana presente em *Doliocarpus dentatus*



2.1.2 *Doliocarpus schottianus*

Doliocarpus schottianus Eichl. é um cipó encontrado na floresta atlântica paranaense que foi descrito pela primeira vez em 1874 na Floresta da Tijuca (MARTIUS et al. 1874). Sua posição taxonômica, segundo a classificação de Cronquist, está na Tabela 3.

Tabela 3 - Posição taxonômica da espécie, segundo Cronquist (CRONQUIST, 1987)

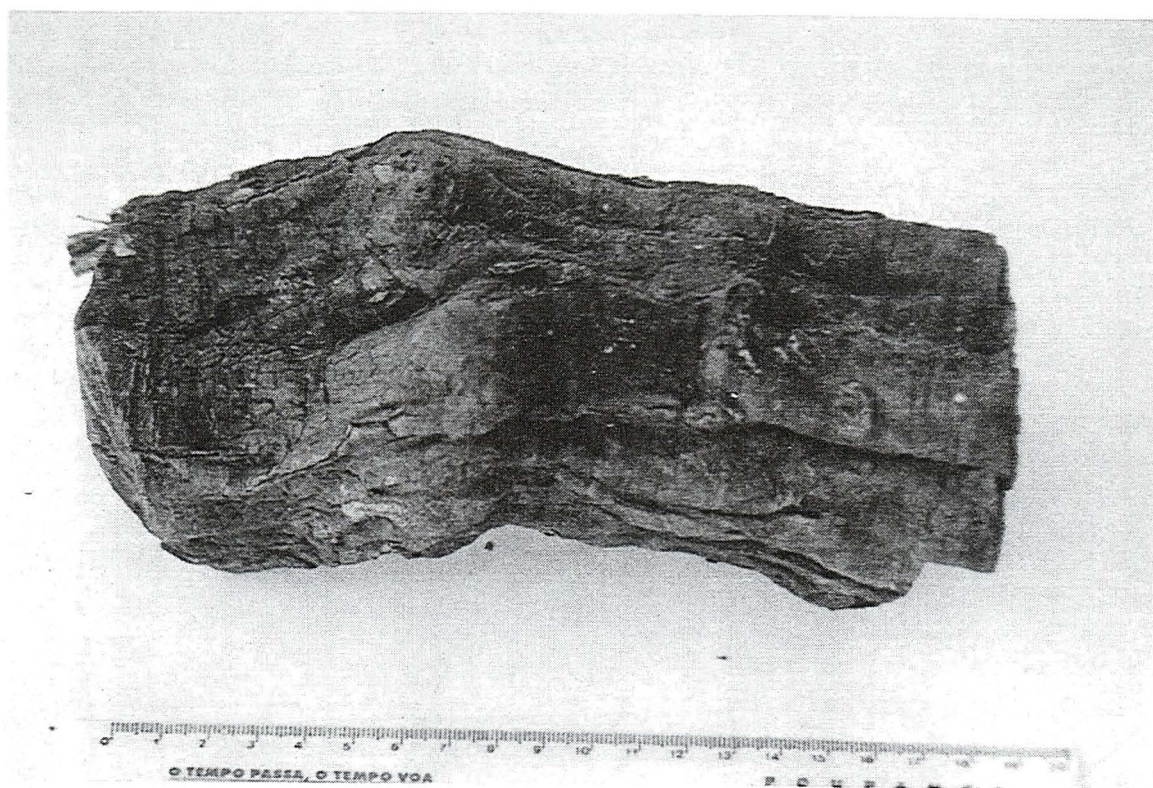
Divisão	Magnoliophyta	Cronquist, Takhtajam & Zimmermas, 1966
Classe	Magnoliopsida	Cronquist, Takhtajam & Zimmermas, 1966
Subclasse	Dilleniidae	Takhtajam, 1966
Ordem	Dilleniales	Hutchinson, 1926
Família	Dilleniaceae	Salisbury, 1807
Gênero	<i>Doliocarpus</i>	Rolander, 1879
Espécie	<i>D. schottianus</i>	Eichler, 1874

Essa planta tem sido usado pela população na forma de chá, como planta medicinal para o tratamento do *diabetes mellitus*, pressão alta e problemas de visão. Possui como nomes populares: capa-homem,

cipó-carimbo, cipó-canela-jacú e cipó-vermelho. Na Figura 14 encontra-se uma foto do material botânico utilizado para o trabalho.

Nenhum trabalho fitoquímico foi encontrado referente ao *D. schottianus*. Entre os poucos compostos já isolados de plantas da família estão alguns triterpenos.

Figura 14 – Material botânico utilizado



2.2 Experimental

2.2.1 Especificação dos materiais e equipamentos

As cromatografias em camada delgada foram realizadas em sílica gel 60 F254 Merck, sendo as fases móveis indicadas no texto e como reveladores foram utilizados irradiação com lâmpadas de UV (254 e 366 nm), vapores de iodo, solução de ácido sulfúrico a 1% e solução de ácido fosfomolibdico-anisaldeído, seguido de aquecimento a 120 °C por 1 minuto (STAHL et al. 1975)

Para as cromatografias de adsorção em coluna foram utilizadas sílica gel 60 35-70 mesh e 230-400 mesh marca Merck e Aldrich 230-400 mesh. Como fases móveis utilizou-se n-hexano, cicloexano, diclorometano, clorofórmio, acetato de etila, acetona e metanol. Os solventes e reagentes foram purificados quando necessário utilizando métodos padrões (TATCHELL, 1989). O ponto de fusão foi determinado em um aparelho Kofler sem correção. Os espectros de infravermelho foram registrados em espectrofotômetro Perkin Elmer em pastilha de KBr. Os espectros de RMN de ^1H e de ^{13}C foram obtidos em espectrofotômetro Varian Gemini 200 e em Varian Inova 300; os deslocamentos químicos estão descritos em δ em relação ao tetrametilsilano (TMS). Os espectros de massa foram obtidos num espectrofotômetro Kratos Concept [ionização por impacto de elétrons (IE) e por ionização química (IQ) com amônia]. Estes espectros foram realizados nos Departamentos de Química da Universidade de Manchester, Inglaterra, da Universidade Federal de São Carlos, Departamento de Química da Universidade Federal de Minas Gerais e no Departamento de Bioquímica da Universidade Federal do Paraná. A

difração de raio-x foi obtida num difratômetro Rigaku AFC 5R no Departamento de Química da Universidade de Manchester.

Unidades e símbolos estão baseados no SI de acordo com a recomendação da IUPAC.

2.2.2 Material Botânico

O caule de *D. schottianus* foi coletado na floresta atlântica do litoral paranaense e identificada pelo Professor Olavo Guimarães, curador do Herbário do Departamento de Botânica da UFPR. O material foi depositado no herbário com o número 40647. O material foi seco à temperatura ambiente e moído.

2.2.3 Marcha sistemática fitoquímica

Parte da planta (15g) foi usada para a marcha fitoquímica para possível detecção dos seguintes metabólitos secundários: taninos hidrolisáveis e condensáveis, saponinas, esteróides e triterpenóides, alcalóides, glicosídeos cianogênicos e cardiotônicos, antocianinas, cumarinas, flavonóides e antraquinonas, seguindo metodologia de CAETANO et al. (1996) e DOMINGUEZ (1973)

2.2.3.1 Pesquisa de taninos

Colocou-se 1g da planta em tubo de ensaio. Adicionou-se 10 mL de água destilada e ferveu-se por 2 minutos. Após filtrar por algodão completou-se o volume para 25 mL. Foram então distribuídos em cinco tubos de ensaio. Com os tubos executou-se as reações de identificação.

- Reação com alcalóide: Ao primeiro tubo acrescentou-se três gotas de solução de cloridrato de quinina a 1% e observar a formação de precipitado.

- Reação com solução de gelatina a 2,5% em solução fisiológica a 0,9% : ao segundo tubo adicionou-se 3 gotas de solução de gelatina 2,5%. Obtenção de precipitado, indica presença de taninos.

- Reação com acetato de chumbo: acrescentou-se à solução no tubo três, duas gotas de solução de acetato de chumbo a 10% e observou-se a ocorrência de turvação ou formação de precipitado.

- Reação com acetato de cobre: acrescentou-se ao tubo quatro, três gotas de solução de acetato de cobre a 4%. Turvação ou precipitação indicaram a presença de taninos.

- Reação com cloreto de ferro: a 5 mL do extrato aquoso adicionou-se 3-5 gotas de cloreto de ferro (solução aquosa a 2%). Observou-se o desenvolvimento de coloração azul, verde cinza.

Coloração azul – taninos hidrolisáveis ou gálicos

Coloração verde – taninos condensados ou catéquicos.

2.2.3.2 Pesquisa de saponinas

Colocou-se 1 g da planta em pó ou fragmentada em tubo de ensaio. Adicionou-se 10 mL de água destilada e ferveu-se por dois minutos. Após resfriar, agitou-se energeticamente por quinze segundos. Mediu-se a espuma formada na hora e após repouso de quinze minutos. Espuma persistente indica a presença de saponinas.

2.2.3.3 Pesquisa de esteróides ou triterpenóides

A 2 g da planta acrescentou-se 10 mL de etanol absoluto. Ferveu-se em banho maria por cinco minutos. Evaporou-se o extrato alcoólico

até secar. O resíduo seco foi dissolvido com 5 mL de clorofórmio. Pipetou-se 0,1, 0,5 e 1,0 mL do extrato clorofórmico para tubos de ensaios e completou-se o volume para 2,0 mL com clorofórmio. Efetuou-se a reação de Lieberman - Bouchardat: 1 mL anidrido acético e 2 mL de ácido sulfúrico concentrado. A formação de uma coloração rósea ou azul esverdeado indica a presença de esteróides e/ou triterpenos.

2.2.3.4 Pesquisa de alcalóides

Acrescentou-se à 2g da planta 10 mL de ácido clorídrico à 1%. Ferveu-se por 2 minutos e filtrou-se por algodão. Basificada a solução com amônia diluída e extraiu-se com clorofórmio. Evaporado o extrato clorofórmico até secar; dissolveu-se o resíduo com HCl 1%; transferiu-se para uma proveta e completou-se o volume para 15 mL. Transferiu-se para tubos de ensaio, 3 mL de extrato hidrocloreídrico (em cada um) e pesquisou-se os alcalóides com os reativos de Mayer, Dragendorff, Bouchardt e Bertrand (formação de precipitados: branco, branco, tijolo, alaranjado, respectivamente).

2.2.3.5 Pesquisa de flavonóides

Ferveu-se 1 g da planta com 10 mL de solução de etanol a 70% por 2 minutos. Filtrou-se por papel de filtro pregueado previamente umedecido com etanol.

Reação de Shinoda: transferiu-se para um tubo de ensaio 5 mL do extrato alcoólico. Adicionou-se 200 mg de limalha de magnésio e 1 mL de ácido clorídrico fumegante (reação exotérmica, banho de gelo). Observou-se o desenvolvimento de coloração rósea ou vermelha, indicando a presença de glicosídeos flavonoídicos.

Reação com tricloreto de alumínio: Umedeceu-se diferentes áreas de papel de filtro com o extrato alcoólico obtido. Colocou-se sobre uma das regiões uma gota de solução de AlCl_3 a 5% e comparou-se a fluorescência sob luz ultravioleta. Intensificação de fluorescência indica reação positiva.

2.2.3.6 Pesquisa de antraquinonas

Adicionou-se à 1 g da droga 8 mL de etanol a 25%. Ferveu-se por 1 minuto e deixou-se em repouso por alguns minutos. Filtrou-se por algodão para um tubo de ensaio contendo 4 mL de solução de ácido sulfúrico a 5% e aquecer. Resfriou-se e extraiu-se com 5 mL de clorofórmio. Transferiu-se a fase orgânica para outro tubo de ensaio e adicionou-se 5 mL de solução de amônia diluída. Agitou-se fortemente e deixou-se em repouso. Coloração rósea ou avermelhada indica a presença de antraquinonas.

2.2.3.7 Pesquisa de cumarinas

Em bequer adicionou-se 0,5 mL de ácido clorídrico 1N à extrato alcoólico obtido aquecendo 2 g da planta com 10 mL de etanol 70% e reduzir em banho-maria até 5 mL. Adicionou-se 5 mL de água e extrair em funil de separação com clorofórmio (3 x 5 mL), reduziu-se o volume do extrato orgânico até 10 mL, adicionou-se 3 gotas do extrato clorofórmico em papel de filtro e deixou-se secar, formando 3 manchas no papel. Adicionou-se uma gota de hidróxido de sódio sobre a mancha 1 e 2. Com a mancha 2 encoberta por uma moeda observou-se, sob luz ultra violeta, fluorescência azul ou amarela na mancha que não foi encoberta. A mancha 3 serve de controle negativo e a mancha 2

(encoberta), também não deve apresentar fluorescência devido à falta de exposição à luz ultra violeta.

Com tubo de ensaio adicionar 5 mL do extrato clorofórmico e 2 mL de NH_4OH concentrado. Agitou-se e observou-se fluorescência azul ou amarela.

2.2.3.8 Pesquisa de antocianinas

Preparou-se 15 mL de extrato aquoso, aquecendo 1 g de planta com água destilada. Separou-se em três porções de 5 mL em tubos de ensaio após filtrar por algodão.

Tubo 1: acidificado com ácido sulfúrico 1N.

Tubo 2: alcalinizado com hidróxido de sódio 1N.

Tubo 3: neutralizado.

Observou-se se houve ou não desenvolvimento de cor.

2.2.3.9 Pesquisa de glicosídeos cianogênicos

Colocar em um tubo de ensaio aproximadamente 2 g do vegetal fragmentado. Umedeceu-se com água e adicionar três gotas de clorofórmio. Suspendeu-se uma tira de papel pico-sódico com auxílio de uma rolha de cortiça, de modo que o papel não tocou o extrato. Levou-se o tubo de ensaio a banho-maria 60°C , por 30 minutos. Em caso de resultado positivo o papel passa gradualmente a amarelo, alaranjado e vermelho.

2.2.4 Preparação e Fracionamento do Extrato pela Metodologia 1

O procedimento está resumido no Fluxograma 1 mostrado a seguir.

Fluxograma 1 – Metodologia 1

O pó da planta (220g) foi submetido à extração aparelho Soxhlet, por aproximadamente 8 horas, com solventes de polaridade crescente. Os solventes utilizados para a extração foram: *n*-hexano, clorofórmio, acetato de etila, etanol e água. Os extratos obtidos foram concentrados em rotavapor e armazenados para posterior estudo, tendo sido nomeados como extrato hexânico, clorofórmico, acetato, etanólico e aquoso. Os extratos clorofórmico e hexânico foram reunidos devido à semelhança entre eles, determinada por CCD, e o extrato agora nomeado HC. O precipitado (2,1g) formado foi separado por filtração, lavado repetidamente com heptano gelado e fracionado em coluna filtrante de sílica gel. Eluiu-se a coluna com *n*-hexano, clorofórmio, acetona e metanol. A fração em que se encontrava a maior quantidade de material foi a extraída com acetona.

A fração acetônica (1,8 g) foi, então refractionada em coluna “flash” de sílica gel, utilizando-se misturas de hexano/acetato de polaridades crescentes como eluente. Foi obtida uma mistura (1,55g) denominada DS-1 aparentemente homogênea (mancha única em CCD). Parte dela foi seca em aparelho de Abdenhalden e analisada por RMN que mostrou que se tratava de uma mistura.

A mistura DS-1 (1,55g) foi então tratada com piridina e anidrido acético na proporção de 5 mL/g de piridina e 10mL/g de anidrido acético. A mistura reacional foi mantida em repouso no escuro por 12 horas. Em seguida a piridina e o anidrido acético foram destilados em evaporador rotatório, utilizando tolueno para formar mistura azeotrópica. O resíduo foi solubilizado em clorofórmio e lavado sucessivamente com ácido clorídrico 5%, solução saturada de bicarbonato de sódio e água. A solução em clorofórmio foi seca com sulfato de sódio anidro, filtrada e o solvente evaporado, obtendo-se

1,31g de material acetilado. Análise por CCD mostrou a presença de quatro substâncias principais (R_f 1; 0,93; 0,73 e 0,23 em *n*-hexano/acetato 9:1) dos quais o de R_f 0,23 em maior quantidade.

O material acetilado foi então fracionado em coluna de sílica gel utilizando misturas de ciclohexano/diclorometano de polaridades crescentes. Foi isolado um sólido DS-1_{ac} (400mg), o qual foi recristalizado em hexano/acetona, com a formação de cristais prismáticos, p.f. 269-271°C. O sólido foi caracterizado como o ácido acetilbetulínico.

2.2.5 Preparação e Fracionamento do Extrato pela Metodologia 2

O procedimento está resumido no Fluxograma 2. A partir de 720 g de caules dessecados e moídos de *Doliocarpus schottianus* Eichler foram preparados extratos a quente por aparelho de soxhlet com clorofórmio e acetato de etila, gerando os extratos nomeados clorofórmico (12,9 g) e acetato (4,00 g).

Doze gramas do extrato clorofórmico foram fracionados em coluna de sílica (CLV). A eluição foi realizada com misturas hexano/acetato de polaridades crescentes e foram coletadas doze frações de 150 mL (Tabela 4). As frações de cinco a oito foram reunidas após a comparação em CCD (hexano/acetato 8:2).

Tabela 4 - Frações do extrato clorofórmico (CLV)

Nome da fração	Eluente	Massa (g)
1	Hexano	0,52
2	hexano/acetato 9:1	0,21
3	hexano/acetato 8:2	1,24
4	hexano/acetato 7:3	0,31
5-8	hexano/acetato 6:4 a 3:7	2,88
9	hexano/acetato 2:8	0,66
10	hexano/acetato 1:9	0,16
11	Acetato	0,51
12	Metanol	0,23

Fluxograma 2 – Metodologia 2

A fração 3 (410 mg) foi, a seguir, consecutivamente refractionada por cromatografia em camada delgada centrífuga (CCDC), utilizando misturas de hexano/acetato 19:1 e depois hexano/clorofórmio 9:1. O primeiro composto isolado (3IC), aparentemente puro por CCD, após análise de RMN revelou ser uma mistura de oleananos.

A Fração 4 foi refractionada consecutivamente mais duas vezes por CCDC com hexano/acetato 9:1, o que forneceu o composto 4D1 (35mg). Este composto foi recristalizado em hexano/acetato e caracterizado como β -sitosterol.

2.2.6 Dados Espectrométricos dos Compostos Isolados

2.2.6.1 DS-1ac

EMIE m/z: 498 $[M]^+$, 456, 220, 208. IV ν_{\max} cm^{-1} : 3461, 3075, 1698, 1643, 1741. RMN ^1H (CDCl_3) δ : 0,62; 0,74; 0,86; 1,2; 1,62, 2,0, 4,52, 4,68, 4,77. RMN ^{13}C (CDCl_3) δ : 14, 15,97, 16,1, 16,4, 18,1, 19,3, 21,2, 23,6, 27,9, 27,9, 29,6, 30,5, 32,1, 34,8, 37,0, 37,7, 37,7, 38,3, 38,3, 40,6, 42,4, 46,9, 49,2, 50,3, 55,3, 56,3, 80,9, 109,0, 150,3, 171,0, 182,0.

2.2.6.2 3IC

RMN ^1H (CDCl_3) δ : 0,8-2,6 multipeto; 5,38; 4,61; 4,05. RMN ^{13}C (CDCl_3) δ : 173,3; 139,7; 122,5; 73,7; 64,4; 56,7; 56,1; 50,0; 45,9; 42,3; 37,0; 36,6; 31,9; 29,7; 29,6; 29,4; 29,3; 29,2; 29,1; 25,0; 22,6; 19,8; 19,0; 14,1; 11,9.

2.2.6.3 4D1

IV ν_{\max} cm^{-1} : 3440; 1666. RMN ^1H (CDCl_3) δ : 0,7-2,4 multipeto; 3,55; 5,10. RMN ^{13}C (CDCl_3) δ : 11,78; 11,91; 18,70; 18,95; 19,33; 19,75; 21,01; 22,98;

24.23; 25.98; 28.17; 29.06; 31.58; 31.58; 33.86; 36.07; 36.42; 37.18; 39.69; 42.22; 42.24; 45.75; 50.04; 56.68; 55.97; 71.72; 140.66; 121.63; 31.82.

2.3 Resultados e Discussão

2.3.1 Identificação de Metabólitos Secundários

No extrato total de *D. schottianus* foram realizados uma série de ensaios preliminares para determinar quais classes de metabólitos secundários estariam presentes nele. Foram feitos ensaios para as seguintes classes de metabólitos: taninos, saponinas, esteroides e triterpenóides, alcalóides, glicosídeos cianogênicos e cardiotônicos, flavonóides e antraquinonas. (CAETANO et al. 1996 DOMINGUEZ, 1973; UGAZ, 1994).

Para taninos foram feitas as reações do extrato com solução: de gelatina a 2%, de cloridrato de quinina a 1%, acetato de chumbo a 10%, acetato de cobre a 4% e finalmente reação com cloreto férrico. Para todas obteve-se resultado positivo com precipitação e na reação com cloreto férrico obteve-se coloração esverdeada característica de taninos do tipo condensados.

Para saponinas foi realizada a pesquisa direta por agitação, não sendo observada a formação de espuma permanente.

Para glicosídeos cianogênicos foi realizada a pesquisa de ácido cianídrico com solução de picrato de sódio, com resultado negativo pois não houve alteração da coloração.

As reações de Keller-Kiliani, Pesez e Kedde foram realizadas para observar a presença de glicosídeos cardiotônicos, tendo resultado positivo apenas na reação de Pesez. Antraquinonas foram detectadas

pela reação direta de Bornträger, que nesse caso, resultado positivo, gerou uma coloração avermelhada.

Os flavonóides foram testados pela reação com tricloreto de alumínio, onde é observado um intensificação da fluorescência em luz ultravioleta a 365 nm. O extrato apresentou resultado positivo na mesma.

A reação de Liberman-Buchard, que se deve a formação de compostos insaturados cromóforos resultantes da desidratação ou desidrogenação do núcleo fundamental, apresentou resultado positivo com desenvolvimento de coloração azul.

A presença de alcalóides foi testada com os reativos gerais para alcalóides, todos apresentando resultado negativo. Os resultados do ensaio fitoquímico encontram-se sumarizados na Tabela 5

Tabela 5 - Pesquisa Fitoquímica no *Doliocarpus schottianus*

Classe Pesquisada	Reação utilizada	Resultado obtido
Taninos	Gelatina 2%	(+) precipitado
	Cloridrato de quinina 1%	(+) precipitado
	Pb(Ac) ₂ 10%	(+) precipitado
	Cu(Ac) ₂ 4%	(+) precipitado
	FeCl ₃ 5%	(+) coloração esverdeada
Flavonóides	Reação com AlCl ₃	(+) Fluorescência aumentada
Cardiotônicos	Reação de Keller-Kiliani	(-) Negativo
	Reação de Pesez	(+) Aumento da fluorescência
	Reação de Kedde	(-) Negativo
Antraquinonas	Reação de Bornträger direta	(+) Coloração avermelhada
Cumarinas		(-) Negativo
Esteróides e Triterpenóides	Reação de Liebermann-Buchard	(+) Coloração azulada
Saponinas	Pesquisa direta por agitação	(-) Negativo
Alcalóides	Pesquisa com prévia extração seguida da reação de Mayer, Dragendorff e Bertrand	(-) Negativo

2.3.2 Fracionamento do Extrato Pela Metodologia 1

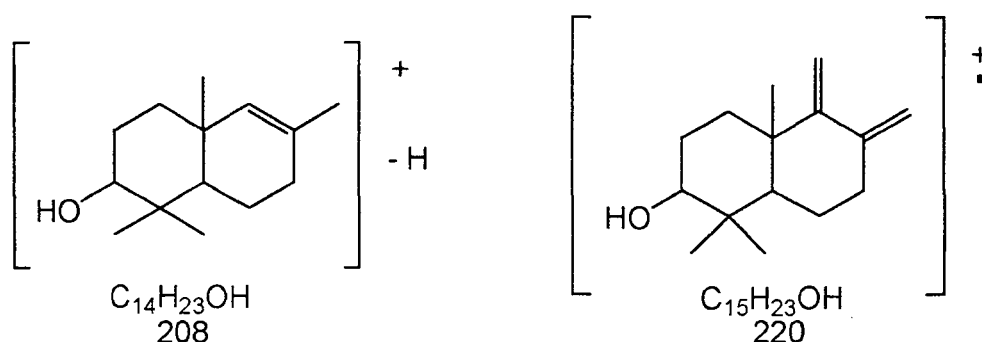
O caule de *D. schottianus* originou extratos apolares obtidos com hexano e CHCl_3 . Os extratos, após separação utilizando cromatografia em coluna, originaram uma mistura de compostos amorfa branca. O espectro de massa dessa mistura apresentava um íon molecular em m/z 456, fórmula molecular $\text{C}_{30}\text{H}_{48}\text{O}_2$ (espectro 1 e 2). O espectro de IV (espectro 3) apresentou uma banda em 3450 cm^{-1} , atribuído a deformação axial de hidroxila, outra em 3080 cm^{-1} referente a deformação axial CH insaturado, e outra em 1699 cm^{-1} referente a deformação axial de carbonila. A presença de carbono insaturado foi observada pela banda em 1645 cm^{-1} . O espectro de RMN de ^{13}C apresentou padrão de picos compatíveis com o de triterpenóides, onde pode ser observada a presença do par de sinais δ 150 e 109 [$\Delta 20(29)$] típicos da dupla ligação exocíclica, encontrada nos esqueletos lupano e hopano, além de um sinal a δ 125, pertencente a uma dupla ligação endocíclica (espectro 4 e 5) (MAHATO & KUNDU, 1994; GALLEGOS & ROQUE, 1991). No caso deste último sinal, fica difícil determinar qual o tipo de esqueleto, por não estar visível no espectro o segundo sinal do par.

Em função dos dados obtidos até então e devido à dificuldade de solubilização de DS-01, optou-se por preparar um derivado acetilado visando solubilizá-lo em clorofórmio, facilitando assim o seu manuseio. O produto de acetilação com anidrido acético e piridina foi purificado por cromatografia em coluna de sílica gel, levando ao DS-01_{ac}.

Do EM foi possível determinar o $[M^+]$ 498 ($[M-\text{acetil}] = 456$), correspondente a uma fórmula molecular $\text{C}_{32}\text{H}_{50}\text{O}_4$, compatível com um composto triterpenóide. O espectro de massa (espectro 6) de DS-01_{ac}

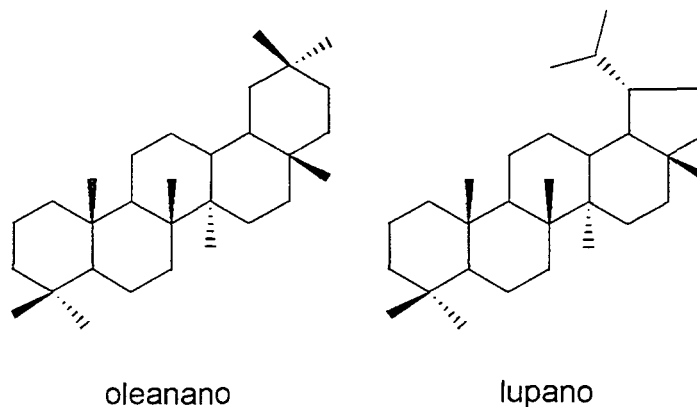
apresentou sinais em m/z 208 ($C_{14}H_{24}O$), 220 ($C_{15}H_{24}O$) (Figura 15) que é correspondente a fragmentos comuns a praticamente todos os tipos de compostos triterpenóides (BUDZIKIEWICZ et al. 1963). Por já terem sido descritos nessa família, os esqueleto do tipo lupano e os do tipo oleanano (Figura 16), foram investigados (SUN et al. 1996; SAUVAIN et al. 1996).

Figura 15 - Fragmentos comuns a triterpenos



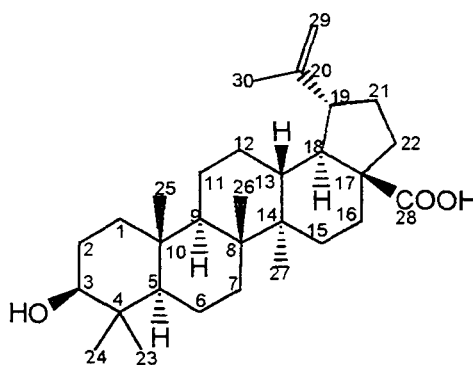
O espectro no infravermelho de DS-01_{ac} (espectro 7), mostrou bandas em 3461 cm^{-1} (deformação axial O-H), 3075 cm^{-1} (deformação axial C-H insaturado), 1698 cm^{-1} (deformação axial da carbonila do ácido na forma de monômero) e 1643 cm^{-1} (deformação axial C-C insaturado), além da banda em 1741 cm^{-1} , referente à carbonila do éster acetato.

Figura 16 - Esqueletos esperados no *D. schottianus*



O espectro de RMN de ^1H , (espectro 8) mostrou os sinais de dupla ligação substituída a δ 4,68 e 4,77, de acordo com o esperado para esse tipo de esqueleto (HILLER et al. 1974). O sinal de H-3 para compostos triterpenóides acetilados em C-3 aparece normalmente a δ 4,5, logo o multiplete a δ 4,52, foi atribuído a este próton. A δ 2,0 observa-se um singlete da metila do radical acetil e em δ 1,62, sendo essa última do radical isopropenila. Os sinais em δ 0,62, 0,74, 0,86 e 1,2 são os singletes referentes às outras metilas do esqueleto triterpênico. O espectro de RMN ^{13}C , (espectro 9) mostrou um par de sinais em δ 150 e 109 [$\Delta^{20}(29)$], sugestivo de esqueleto lupênico (Figura 16). O sinal em δ 181 é característico para carboxila no carbono 28 enquanto que o sinal em δ 80,9 se refere ao C3 com hidroxila acetilada. Os dados acima, resumidos na Tabela 6, foram compatíveis com a estrutura do ácido betulínico acetilado (MAHATO & KUNDU, 1994) A numeração do ácido acetil betulínico encontra-se na Figura 17.

Figura 17 – Estrutura do ácido betulínico numerada



Apesar dos dados indicarem a estrutura do acetato do ácido betulínico para DS-01_{ac}, permanecia ainda a dúvida se ele seria o próprio ou o ácido epi-betulínico, pois no espectro de RMN ^{13}C em 400MHz de

DS-01 (espectro 4), tem-se um valor de δ 77,1 para o C3. O valor padrão para 3α -OH é de δ $76,1\pm0,5$ e de δ $78,6\pm0,5$ para 3β -OH. DS-01_{ac} apresentou δ 80,9 para o carbono 3, que na literatura é condizente para 3β -OAc (Figura 18) (GALLEGOS, 1990).

Figura 18 - Estereoquímica do carbono 3

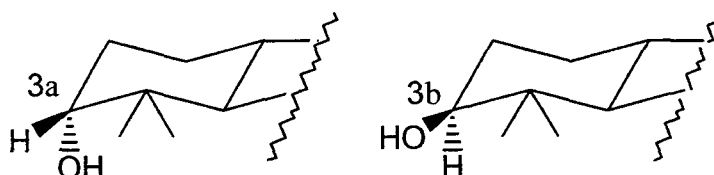
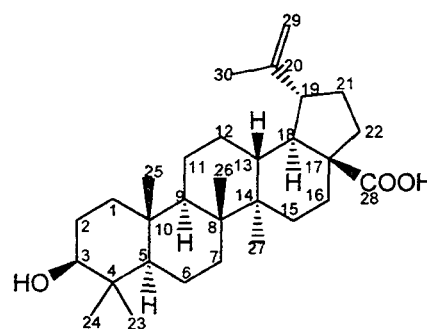


Tabela 6 –Dados espectrométricos de Ds-01_{ac} e do ácido betulínico

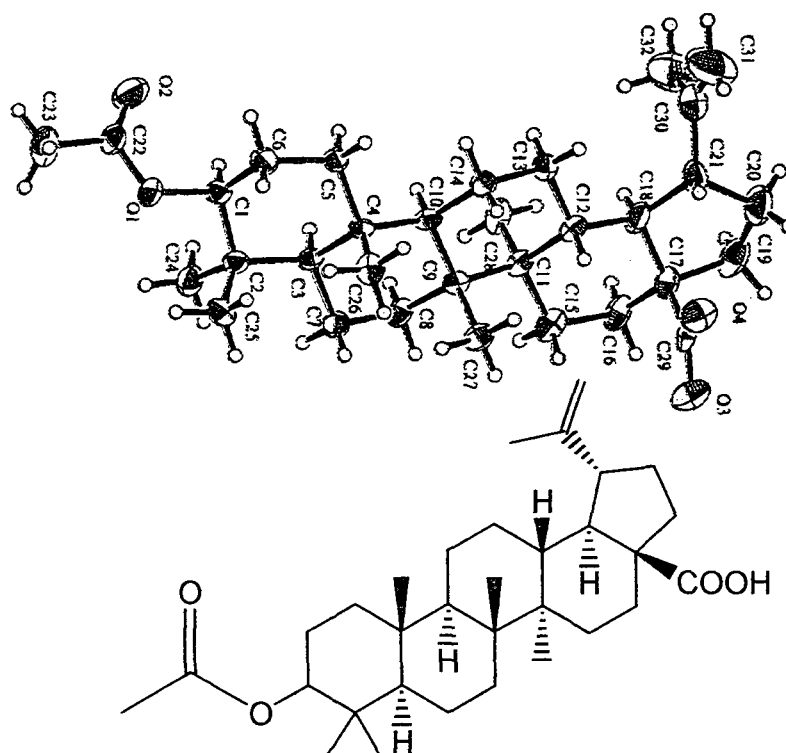
C	DS-01 _{ac}	Ác. Betulínico ⁽¹⁾
1	38.34	38.7
2	23.62*	27.4
3	80.89	78.9
4	37.73	38.8
5	55.34	55.3
6	18.09	18.3
7	34.17	34.3
8	40.62	40.7
9	50.33	50.5
10	37.73	37.2
11	21.24	20.8
12	27.88*	25.5
13	38.35	38.4
14	42.35	42.4
15	30.50	30.5
16	32.08	32.1
17	56.31	56.3
18	46.87	46.8
19	49.19	49.2
20	150.29	150.3
21	29.62	29.7
22	37.05	37.0
23	27.88	27.9
24	15.97	15.3
25	16.10	16.0
26	16.39	16.1
27	14.58	14.7
28	182	180.5
29	109	109.6
30	19.28	19.4
OCOCH ₃	171	



¹- (MAHATO & KUNDU, 1994); * Valores podem estar invertidos

Em função de ter sido obtido cristais ortorromboédricos de boa qualidade após cristalização na mistura n-hexano/acetona, foi feita análise da difração de raio-x com a finalidade de confirmar a estrutura. O resultado (Figura 19) mostrou que DS-01ac era, de fato, o acetato do ácido betulínico (ácido 3β-hidroxi-20(29)-lupen-28-oico).

Figura 19 – Difração de raio-x de DS-1_{ac}



O ácido betulínico isolado neste trabalho pela primeira vez em *D. schottianus*, tem estado em evidência nos últimos anos por apresentar atividades farmacológicas muito importantes. Fujioka et al. (1994) relataram o isolamento do ácido betulínico de *Syzygium clavifolium*, tendo sido este o primeiro trabalho associando-o com uma ação anti-HIV. Neste mesmo artigo eles relataram a avaliação de alguns derivados do

ácido como o dihidrobetulínico que mostrou também ser um potente inibidor da replicação viral.

A partir de derivados do ácido betulínico (EVERS et al. 1996), descobriu-se um novo mecanismo de inibição do HIV-1, no qual esses compostos interferem na entrada do vírus na célula.

Em 1991, Yasukawa et al. (1991) descreveram a ação do ácido betulínico inibindo a formação de tumores em pele de ratos. Pisha et al. (1995) descreveram a atividade do ácido betulínico como inibidor seletivo do melanoma humano, através de indução da apoptose. Melzig (MELZIG & BORMANN, 1998) posteriormente demonstra que a ação antimelanoma seria por inibição da aminopeptidase N.

Sua atividade contra melanoma, o tipo de câncer cuja incidência mais tem aumentado, levou a uma patente pelo grupo do Dr. John Pezzuto da Universidade de Illinois em Chicago (UICNews, 1999, Novel, 1999). Há várias páginas na Internet, algumas exclusivas para o ácido betulínico, como a “Dave Walzer’s Betulinic Acid Page”, e a “Betulinic Acid Research” sendo em alguns casos considerado como a nova esperança, após o taxol.

Existem ainda outros trabalhos que associam o ácido betulínico à indução de apoptose em linhagens celulares de neuroblastoma humano (SCHMIDT, 1997), meduloblastoma, tumores neuroectodermicos e sarcoma de Ewing, principais tipos de tumores sólido a atingir crianças (FULDA et al. 1997). O composto está atualmente em fase de testes pré-clínicos.

Ácido betulínico, isolado de *Triphyophyllum peltatum* e *Ancistrocladus heyneanus*, mostrou de moderada a boa atividade antimalária in vitro contra o estágio sexual eritrocitário do *Plasmodium falciparum* (BRINGMANN et. Al. 1997). Outro trabalho (STEELE et al. 1999) confirmou esta ação, em estirpes de *Plasmodium falciparum* resistentes (K1)

e sensíveis (T9-96) à cloroquina *in vivo*. Em um modelo para malária (*P. berghei*) utilizando camundongos, o ácido não reduziu a parasitemia e apresentou certa toxicidade.

O ácido betulínico tem mostrado interessante atividade biológica como antiinflamatório (SAFAYHI et al. 1997), antibacteriano para *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*, sendo o mecanismo mais provável a inibição de proteinaquinas (PISHA, 1995).

2.3.3 Fracionamento do Extrato pela Metodologia 2

Devido às dificuldades encontradas na solubilização e ao longo tempo despendido com a metodologia utilizada, resolveu-se proceder a outro método de fracionamento para o isolamento de outros triterpenóides.

Para reduzir o tempo de fracionamento resolveu-se, desta vez, utilizar cromatografia em coluna à vácuo (CLV), seguida de cromatografia em camada delgada centrífuga (CCDC).

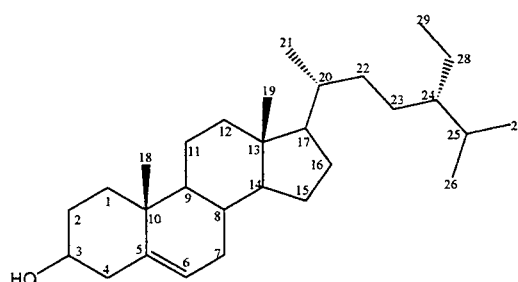
Após utilização destas técnicas foi isolado o composto 4D1, que apresentou no espectro de IV absorções em 3440 cm^{-1} (deformação axial OH), 3031 cm^{-1} (deformação axial CH insaturado), e 1666 cm^{-1} (deformação axial C-C insaturado) (espectro 10). O espectro de RMN ^1H (espectro 14) mostrou o sinal correspondente ao hidrogênio ligado a C3, um multipeto centrado em 3,55, e um multipeto referente à dupla ligação, em δ 5,1. O espectro de RMN ^{13}C (espectro 11) mostrou 29 sinais, indicando triterpenóide esteroidal. Em δ 140,66 e 121,63 estão os únicos sinais referentes a insaturações, sendo estas compatíveis com insaturações na posição 5(6) (UGAZ, 1994). O sinal em δ 71,72 é compatível com hidroxila na posição 3. A comparação dos dados acima

com os da literatura (ALMEIDA, 1996) permitiu identificar o composto como β -sitosterol (Tabela 7).

Tabela 7 - Dados espectrométricos de 4D1

Atribuição	4D1	β -Sitosterol ¹	
C-1	42,22	37.39	CH ₂
C-2	31.58	29.64	CH ₂
C-3	71,72	80.0	CH
C-4	37,18	38.9	CH ₂
C-5	140,66	140.2	C
C-6	121,63	122.2	CH
C-7	31,58	31.9	CH ₂
C-8	31,82	31.8	CH
C-9	50,04	50.1	CH
C-10	36,42	36.7	CH
C-11	21,01	21.0	C
C-12	39,69	39.7	CH ₂
C-13	42,24	42.3	C
C-14	56,68	56.7	CH
C-15	24,23	24.3	C
C-16	28,17	28.2	CH ₂
C-17	55,97	56.0	CH
C-18	11,78	11.9	CH ₃
C-19	19,33	19.3	CH ₃
C-20	36,07	36.1	C
C-21	18,70	19.0	CH ₃
C-22	33,86	34.4	CH ₂
C-23	25,98	26.1	CH ₂
C-24	45,75	46.0	CH
C-25	29,06	29.2	C
C-26	18,95	18.8	CH ₃
C-27	19,75	19.8	CH ₃
C-28	22,98	23.1	C
C-29	11,91	12.0	CH ₃

¹ – sitosterol glicosilado (ALMEIDA, 1996)

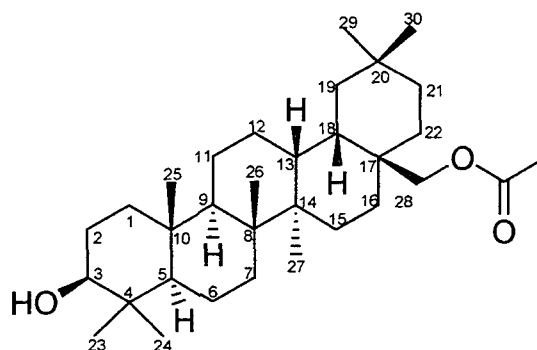


O segundo composto isolado 3IC, apesar de aparentemente puro por CCD, após análise de RMN revelou se tratar de uma mistura de triterpenóides, que não foi possível separar. Seu espectro de RMN ¹H (espectro 15) mostrou sinal correspondente ao hidrogênio ligado a C-3,

como um multipletto centrado em 4,6. O espectro de COSY (espectro 16) mostra o acoplamento dele com dois hidrogênios (δ 1,61 e 1,59) e multipletto com δ 5,38 para o sinal da dupla ligação. O espectro de RMN ^{13}C desacoplado (espectro 17) mostrou sinal em δ 173,3, atribuído a uma carboxila de éster. Em δ 139,7 e 122,5 estavam os sinais referentes à dupla ligação presente no esqueleto, sendo estas compatíveis com insaturações na posição 12(13), característico do esqueleto oleanano. O sinal δ 73,6 é compatível com hidroxila na posição 3. O conjunto de sinais 173,3 e 23,2 se refere a um grupo acetil, que está provavelmente ligado em C28, compatível com os valores da literatura (MAHATO & KUNDU, 1994), levando a proposta de um triterpenóide pentacíclico de esqueleto oleanano substituído.

Tabela 8 - Dados espectrométricos de 3IC e possível atribuição

Atribuição	3IC
C-1	38.08
C-2	22.99
C-3	73.60
C-4	37.03
C-5	55.96
C-6	19.73
C-7	31.85
C-8	22.67
C-9	45.76
C-10	36.61
C-11	24.21
C-12	122.49
C-13	139.7
C-14	42.33
C-15	28.58
C-16	26.01
C-17	21.04
C-18	56.62
C-19	49.96
C-20	31.85
C-21	34.34
C-22	39.65
C-23	29.03
C-24	18.69
C-25	11.89
C-26	19.73
C-27	29.08
C-28	64.32
C-29	31.79
C-30	23.17



Outras frações aparentemente puras foram obtidas nos dois fracionamentos. Entretanto, após análise por RMN concluiu-se que eram misturas cuja natureza e pequena quantidade não permitiu o isolamento e a caracterização de seus componentes

2.4 Conclusão

A família Dilleniaceae é pouco estudada e apresenta potencial para fornecer compostos com atividades farmacológicas, como o ácido

betulínico, pois representantes do gênero *Dollicarpus* tem sido utilizados pela população do Paraná em fitoterapia.

A pesquisa fitoquímica do *D. schottianus* apresentou resultados positivos para taninos, flavonóides e triterpenóides, resultado condizente com o encontrado na literatura para plantas da família Dilleniaceae. Também apresentou resultado positivo para a reação de Borntrager que pesquisa antraquinonas.

Os resultados mostraram que *D. schottianus* possui triterpenos do tipo lupano e oleanano, a exemplo do que foi encontrado em outras espécies da família previamente estudadas. Nesse trabalho foram isolados o ácido betulínico o β -sitosterol e uma mistura de triterpenos de esqueleto oleanano relacionado com a β -amirina.

Este é um trabalho inicial com a planta, que vai ser continuado com o isolamento de outros compostos e encaminhamento dos compostos isolados para ensaios farmacológicos.

2.5 Espectros de RMN

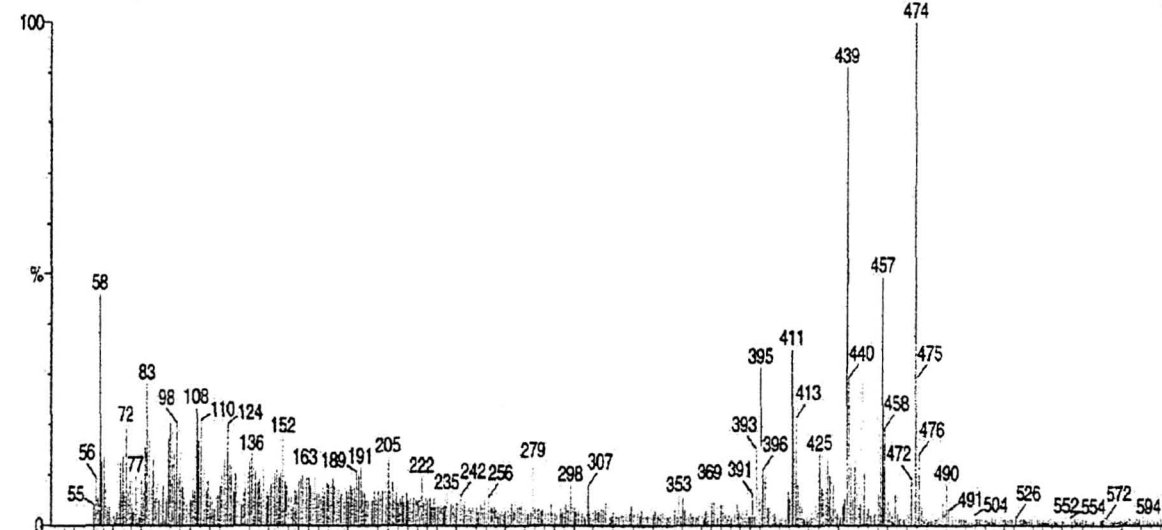
Espectro 1 – Espectro de massa de DS-01

Manchester University

L0198181 6 (2.410)

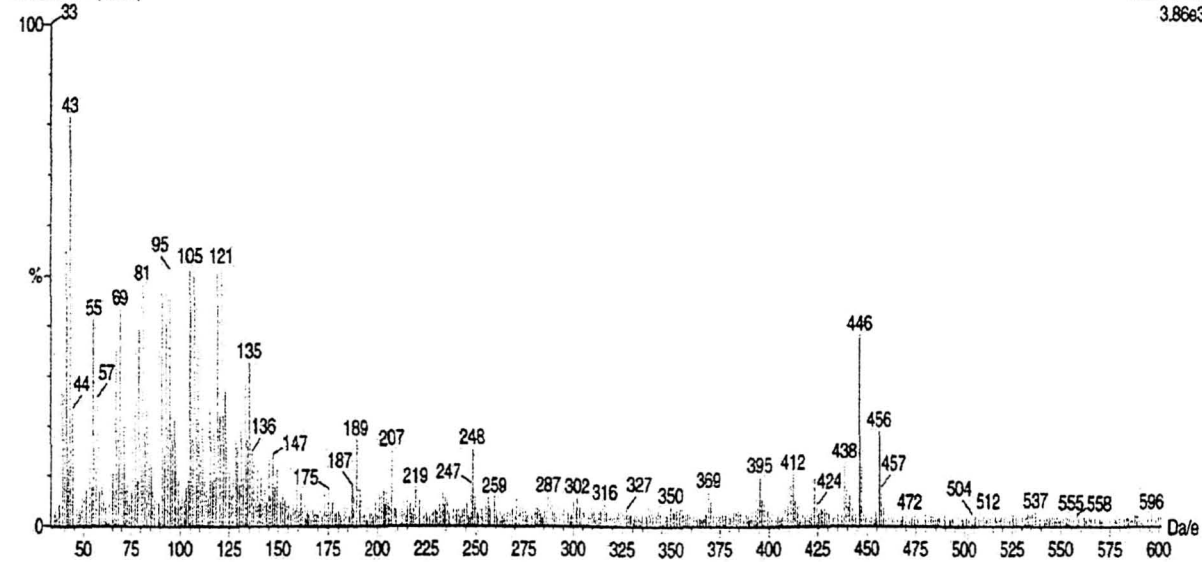
TRIO2000

2: Scan Cl+
1.13e4



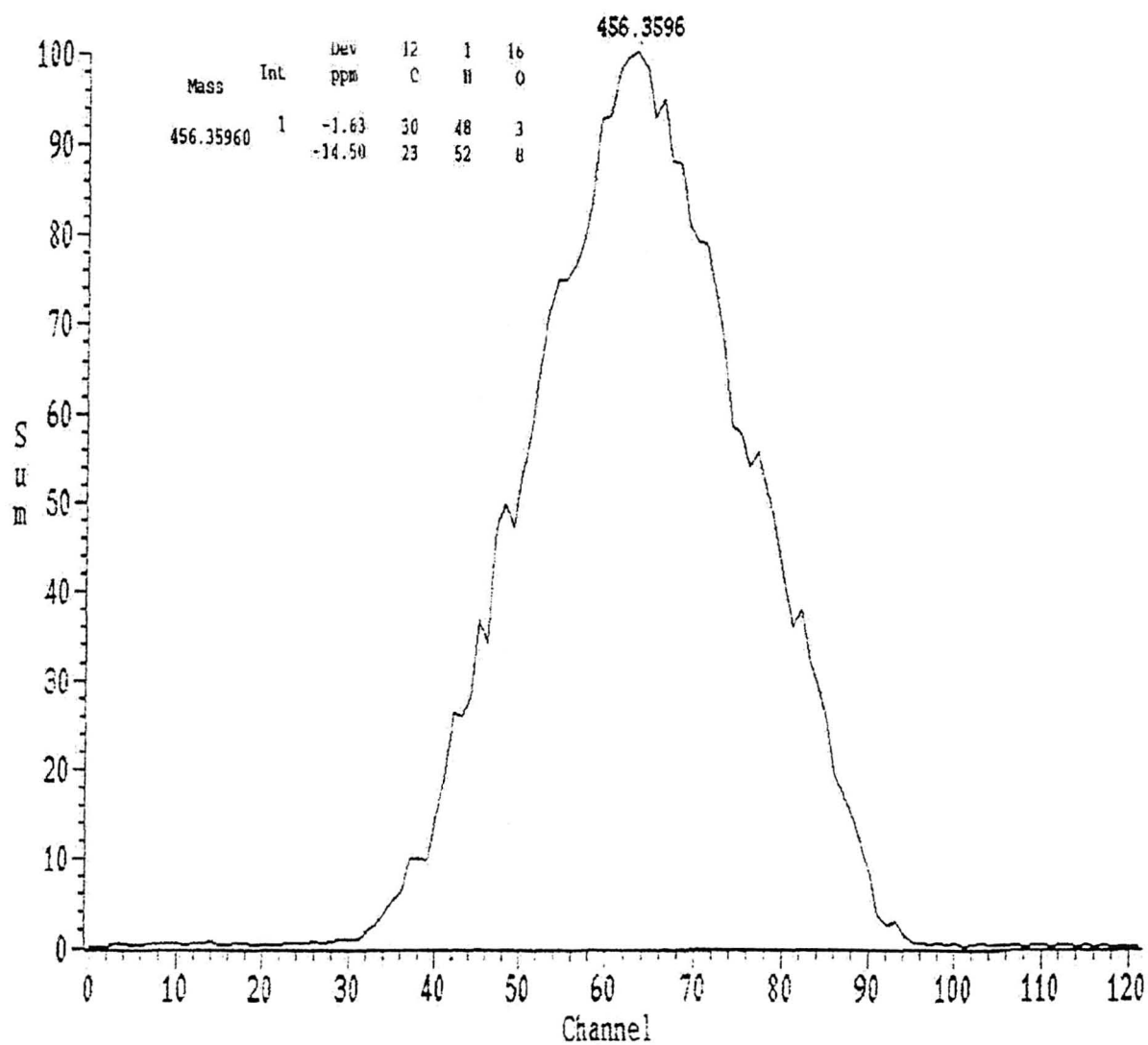
L0198181 7 (2.465)

1: Scan El+
3.86e3

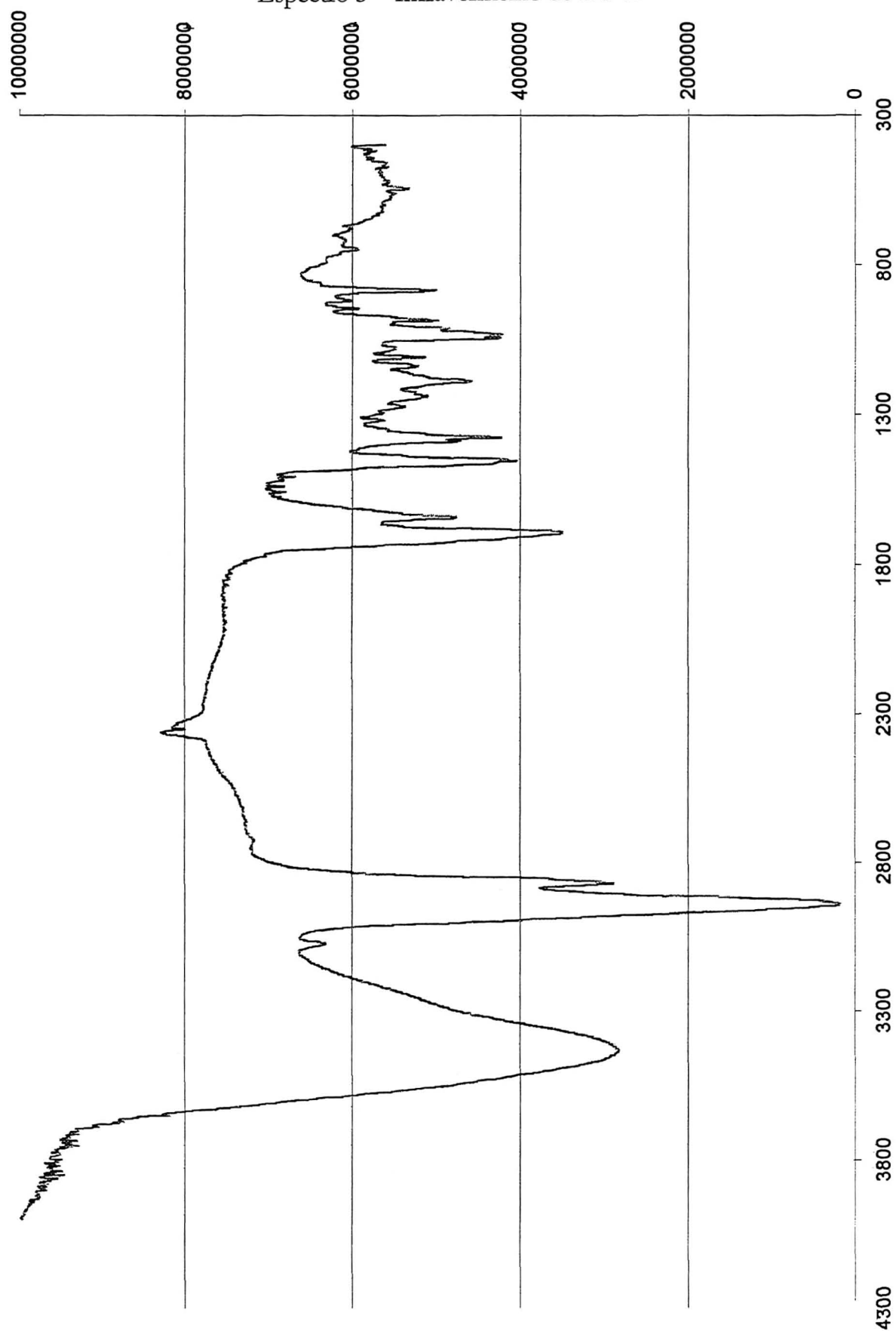


Espectro 2 – Medição exata de massa de DS-01

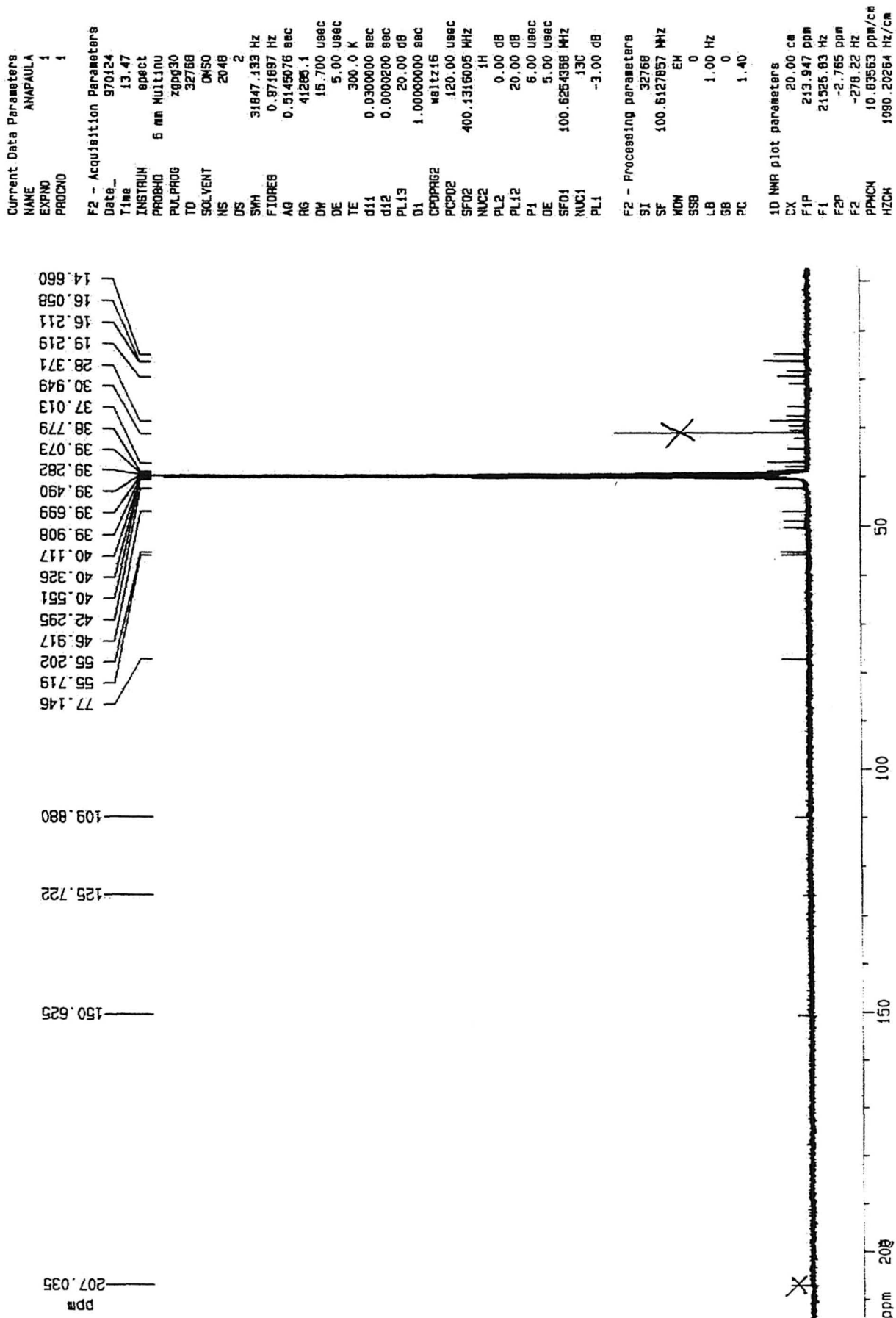
Santos DS-1 30 Jan 98 4:51 am Peak Match +EI
hr0737 Gr 2 U1 456.4 scans 35-35 100%= 979mV



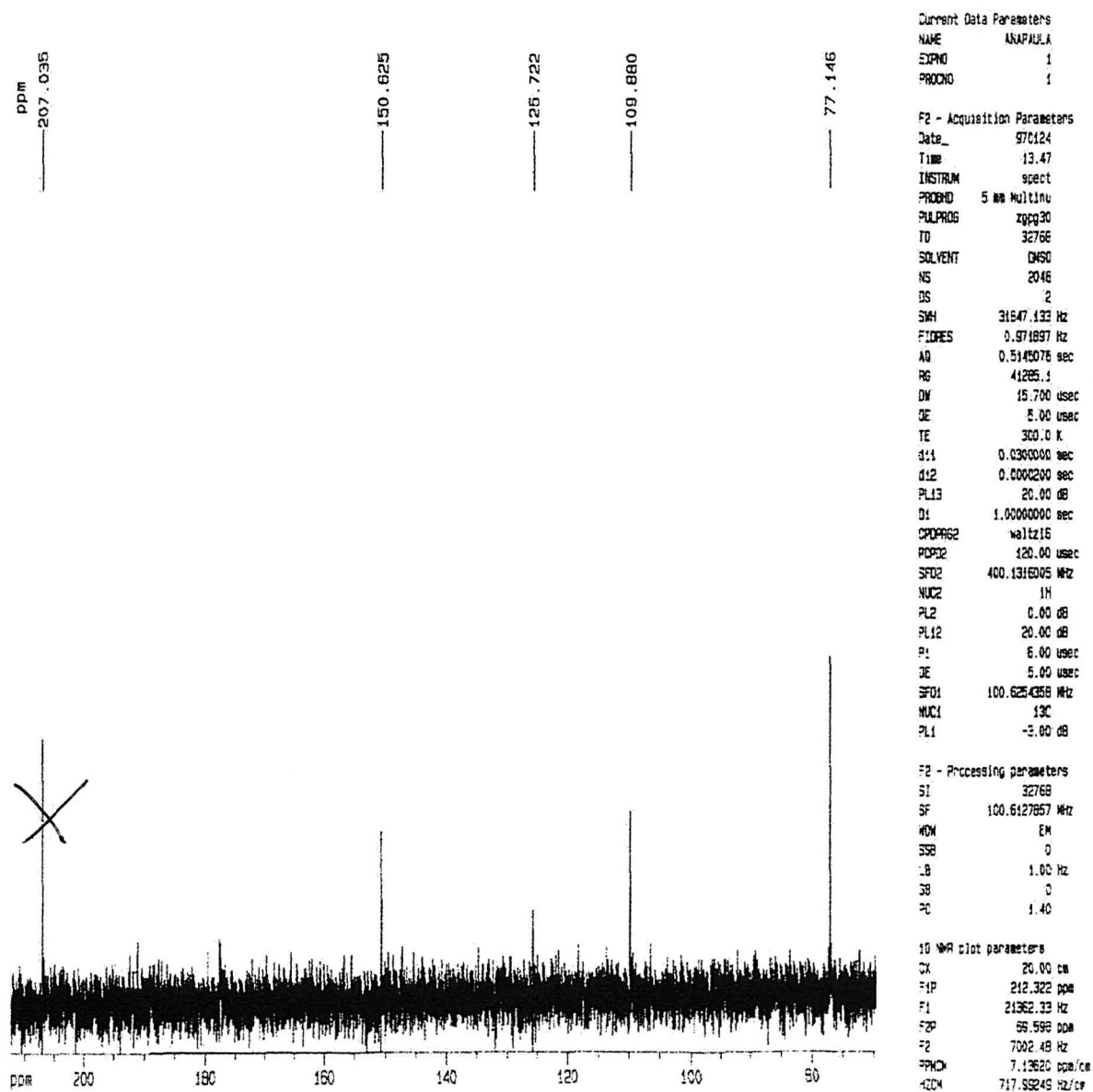
Espectro 3 – Infravermelho de DS-01



Espectro 4 – RMN ¹³C de DS-01

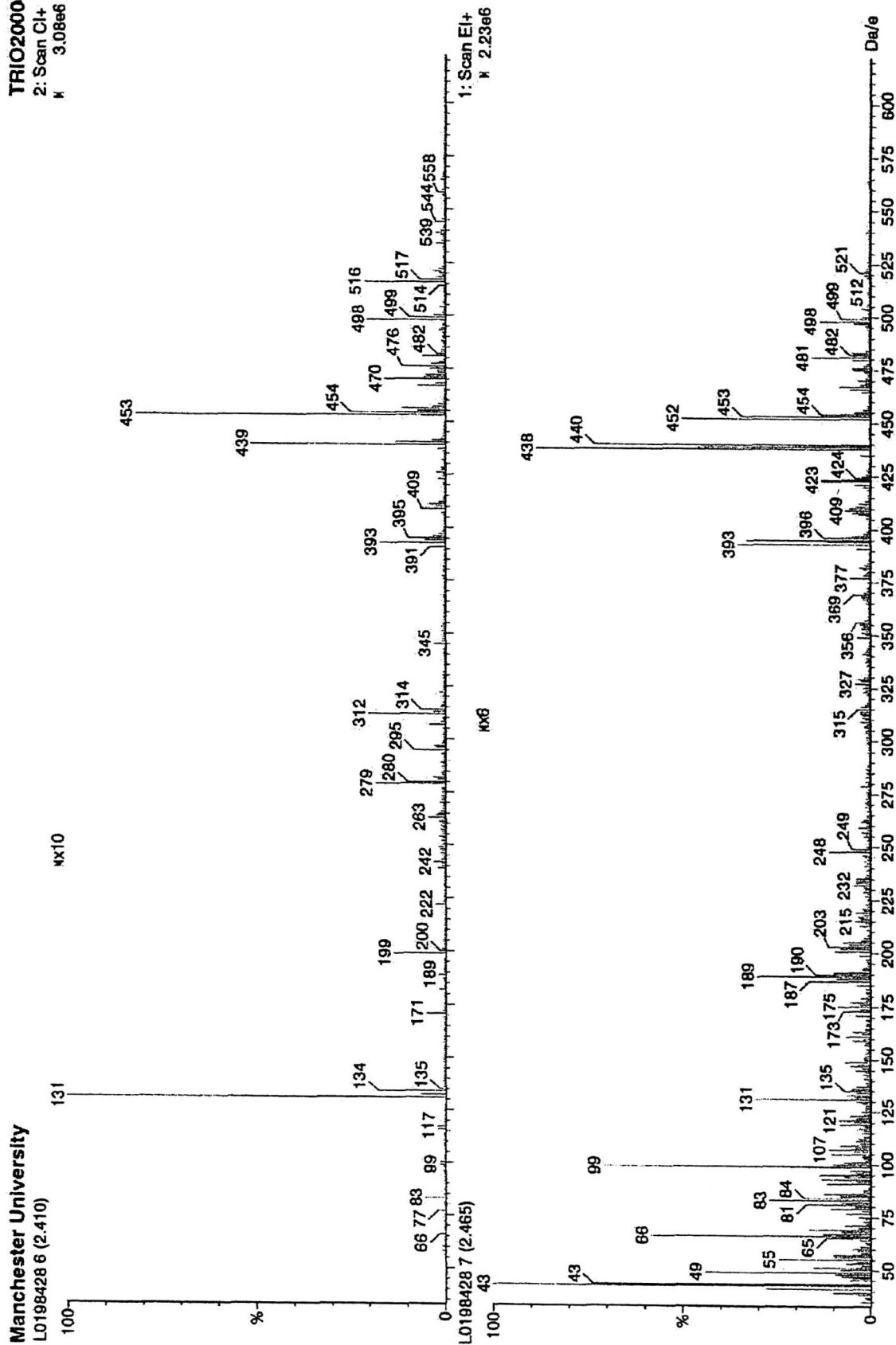


Espectro 5 – Ampliação do RMN ^{13}C de DS-01

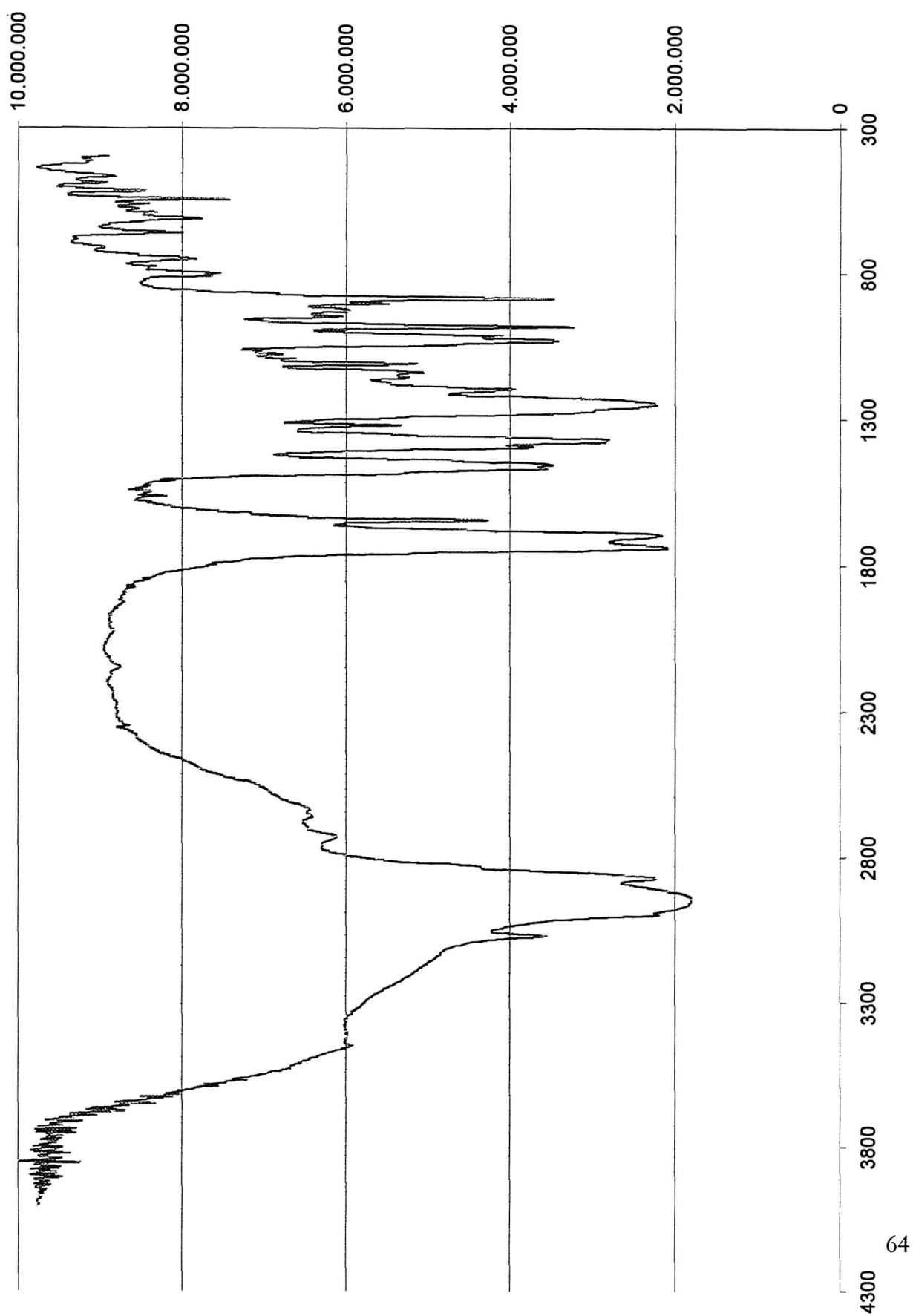


Espectro 6 - Espectro de massa de DS-01_{ac}

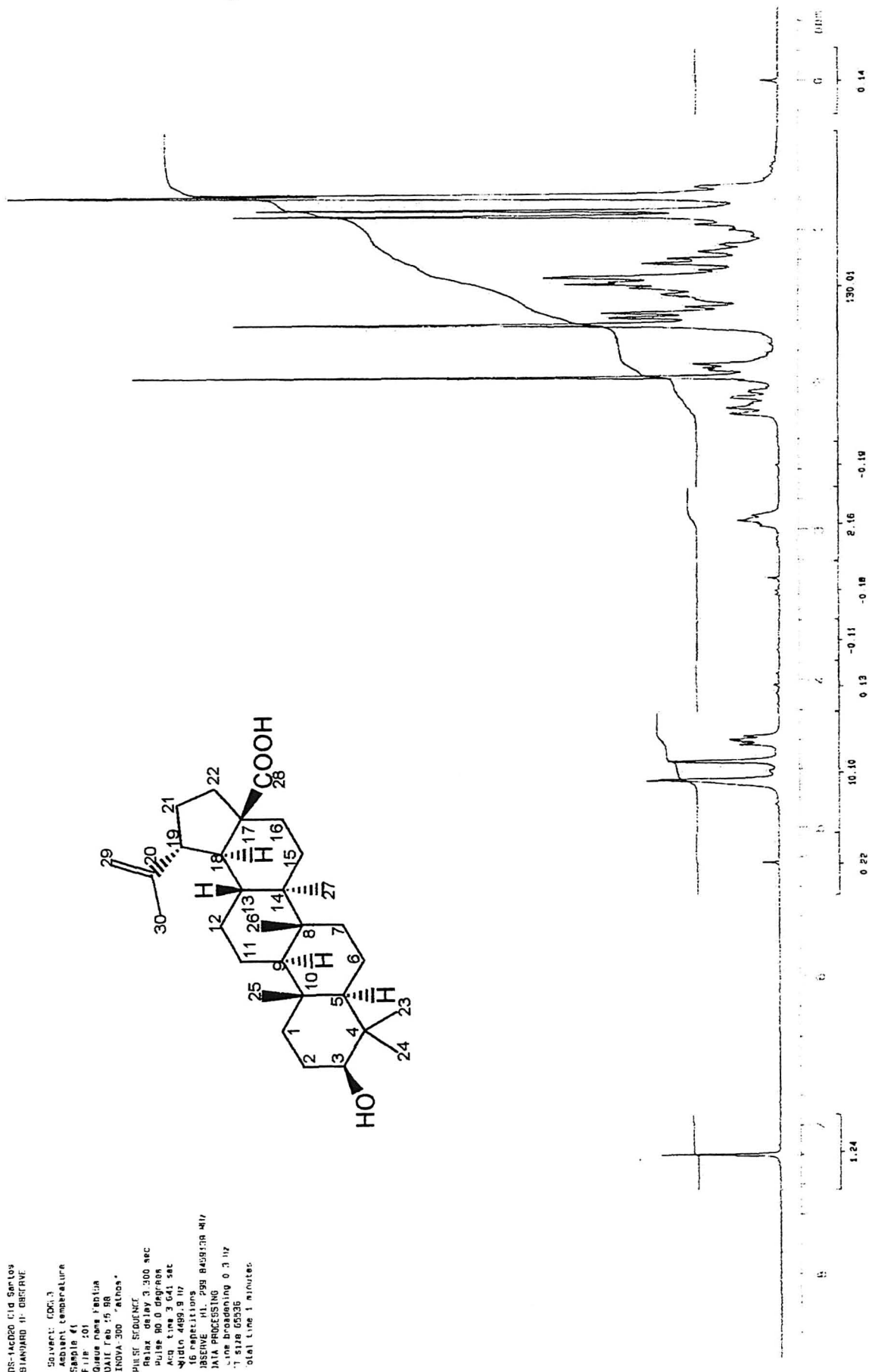
TRIO2000
2: Scan Cl+
N 3.08e6



Espectro 7 – Infravermelho de DS-01_{ac} (ácido betulínico)



Espectro 8 – RMN ^1H de DS-01_{ac} (ácido betulínico)



Espectro 9 – RMN ¹³C de DS-01_{ac} (ácido betulínico)

DS-142
13C OBSERVE

Solvent: DMSO
Ambient temperature

Sample 87
Date Feb 14 08

NOVA-300 "Altoq"
Pulse sequence

NOVA-300 "Altoq"
Pulse sequence

NOVA-300 "Altoq"
Pulse sequence

NOVA-300 "Altoq"
Pulse sequence

NOVA-300 "Altoq"
Pulse sequence

NOVA-300 "Altoq"
Pulse sequence

NOVA-300 "Altoq"
Pulse sequence

NOVA-300 "Altoq"
Pulse sequence

NOVA-300 "Altoq"
Pulse sequence

NOVA-300 "Altoq"
Pulse sequence

NOVA-300 "Altoq"
Pulse sequence

NOVA-300 "Altoq"
Pulse sequence

NOVA-300 "Altoq"
Pulse sequence

NOVA-300 "Altoq"
Pulse sequence

NOVA-300 "Altoq"
Pulse sequence

NOVA-300 "Altoq"
Pulse sequence

NOVA-300 "Altoq"
Pulse sequence

NOVA-300 "Altoq"
Pulse sequence

NOVA-300 "Altoq"
Pulse sequence

NOVA-300 "Altoq"
Pulse sequence

NOVA-300 "Altoq"
Pulse sequence

NOVA-300 "Altoq"
Pulse sequence

NOVA-300 "Altoq"
Pulse sequence

NOVA-300 "Altoq"
Pulse sequence

NOVA-300 "Altoq"
Pulse sequence

NOVA-300 "Altoq"
Pulse sequence

NOVA-300 "Altoq"
Pulse sequence

NOVA-300 "Altoq"
Pulse sequence

NOVA-300 "Altoq"
Pulse sequence

NOVA-300 "Altoq"
Pulse sequence

NOVA-300 "Altoq"
Pulse sequence

NOVA-300 "Altoq"
Pulse sequence

NOVA-300 "Altoq"
Pulse sequence

NOVA-300 "Altoq"
Pulse sequence

NOVA-300 "Altoq"
Pulse sequence

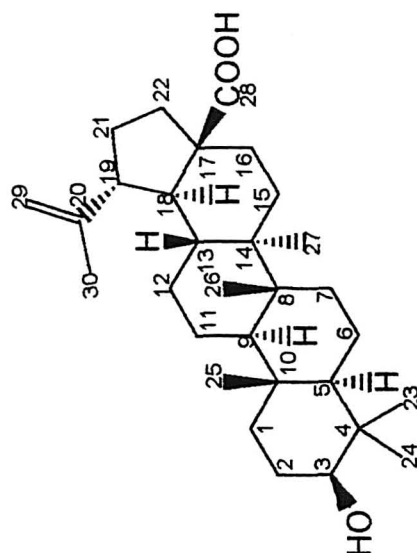
NOVA-300 "Altoq"
Pulse sequence

NOVA-300 "Altoq"
Pulse sequence

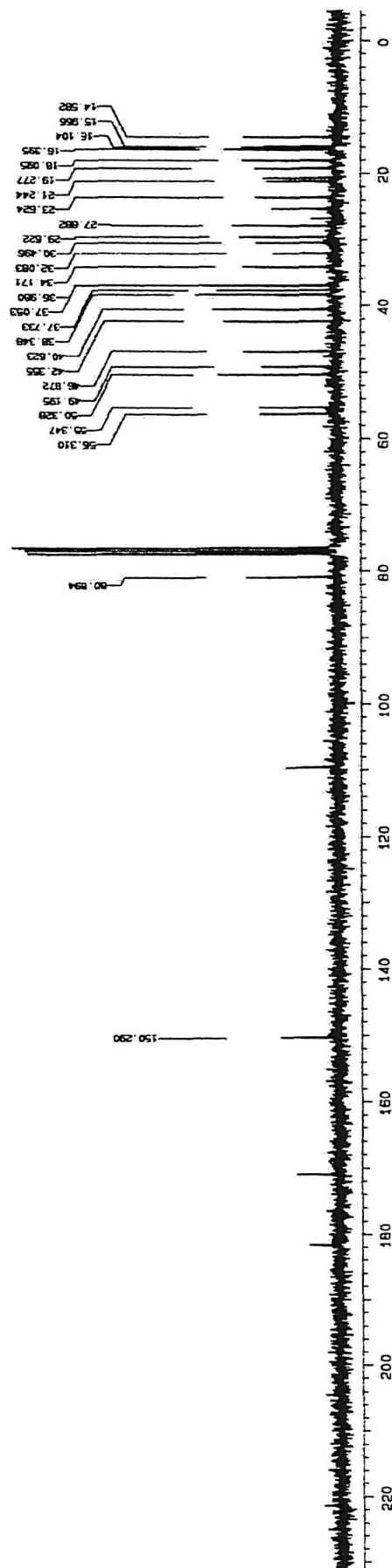
NOVA-300 "Altoq"
Pulse sequence

NOVA-300 "Altoq"
Pulse sequence

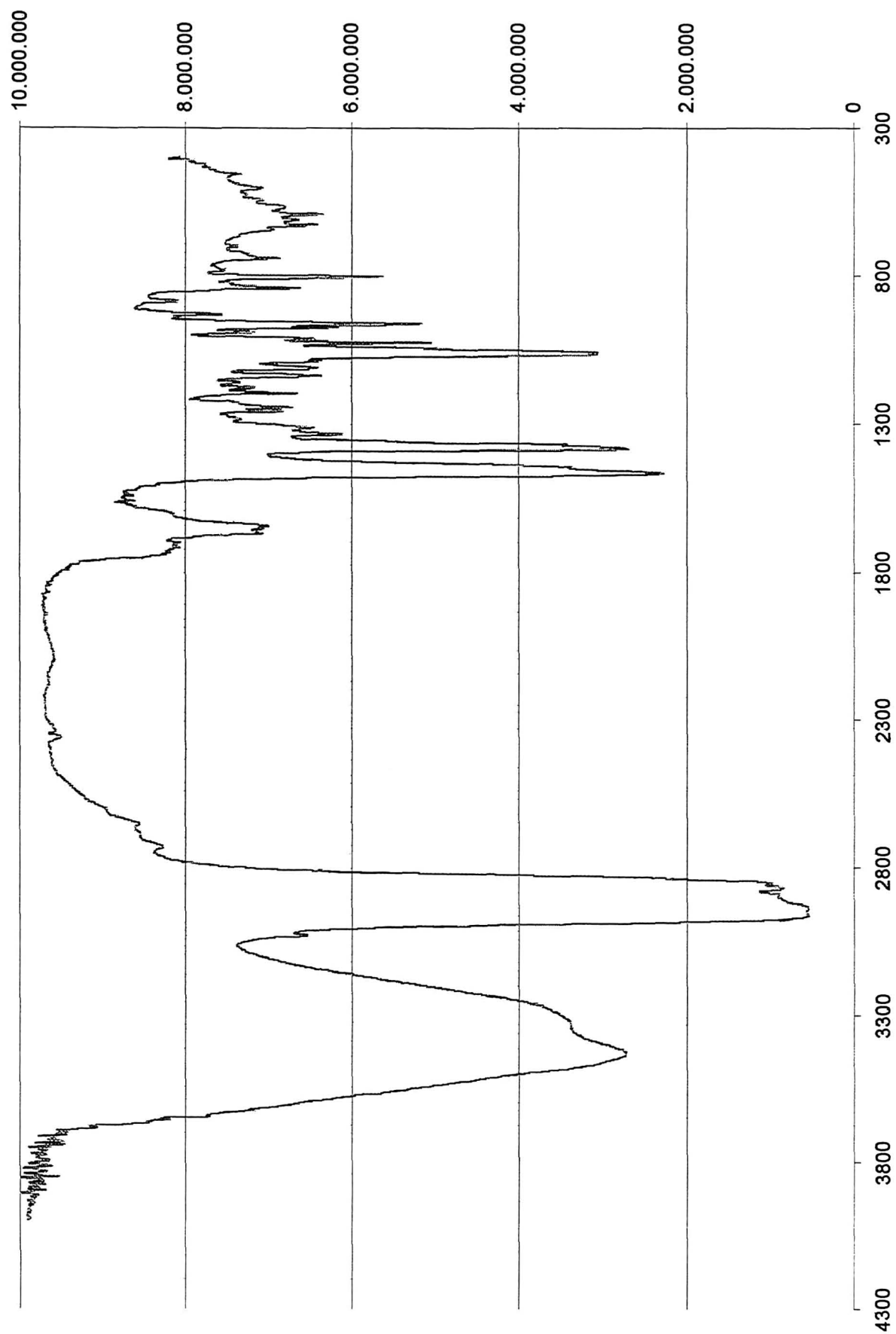
NOVA-300 "Altoq"
Pulse sequence



76.515
76.506
77.367

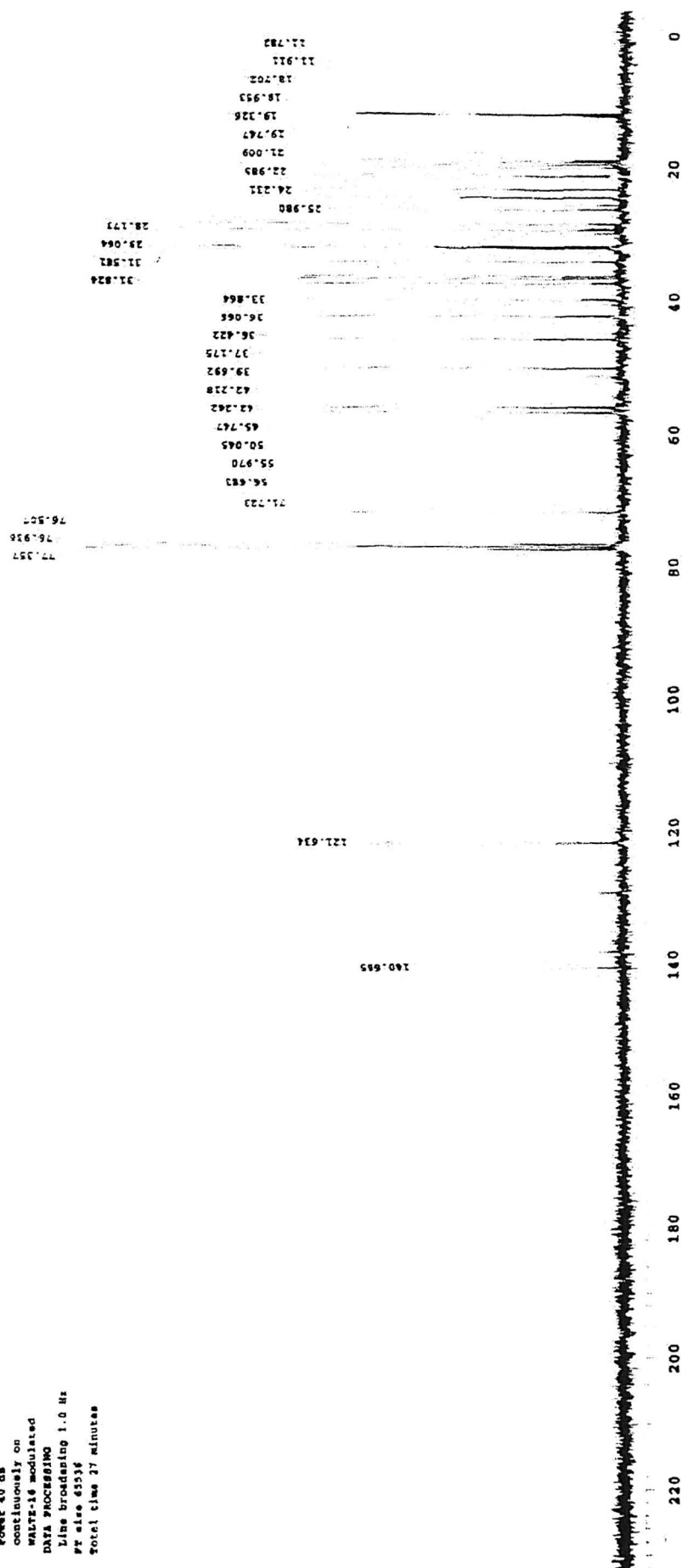


Espectro 10 – Infravermelho de 4D1 (sitosterol)

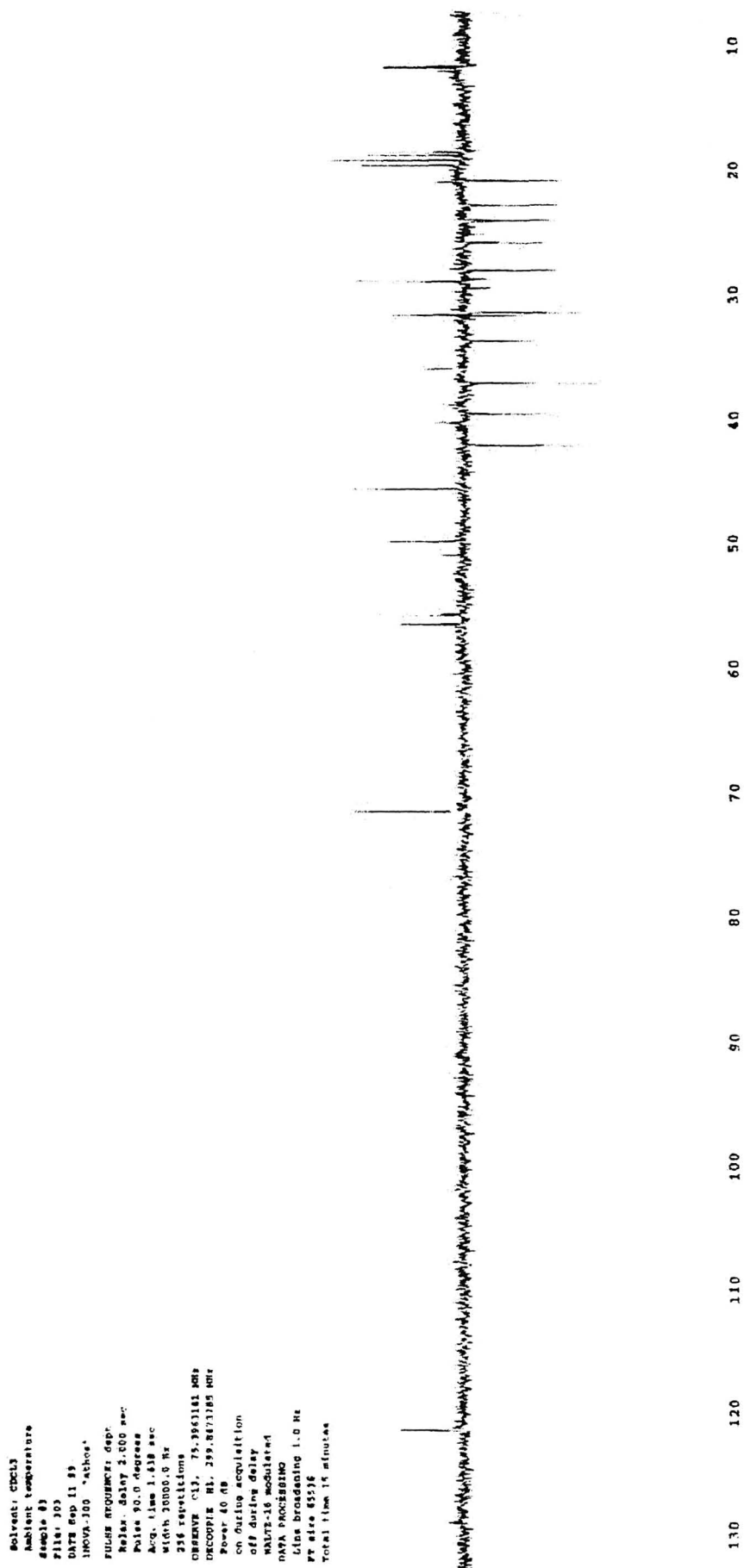


Espectro 11 – RMN ¹³C desacoplado de 4D1 (sitosterol)

Solvent: CDCl₃
 Ambient temperature
 Sample B1
 File: 801
 Queue name: 8007b
 DATE Sep 3 19
 INOVA-100 "athus"
 PULSE SEQUENCE
 Pulse 45.0 degrees
 Acq. time 1.638 sec
 Width 20000.0 Hz
 1024 repetitions
 OBSERVE C13, 75.1963141 MHz
 DECOUPLE H1, 229.8875785 MHz
 Power 40 dB
 Continuously on
 WALTZ-16 modulated
 DATA PROCESSING
 Line broadening 1.0 Hz
 FT size 65536
 Total time 27 minutes

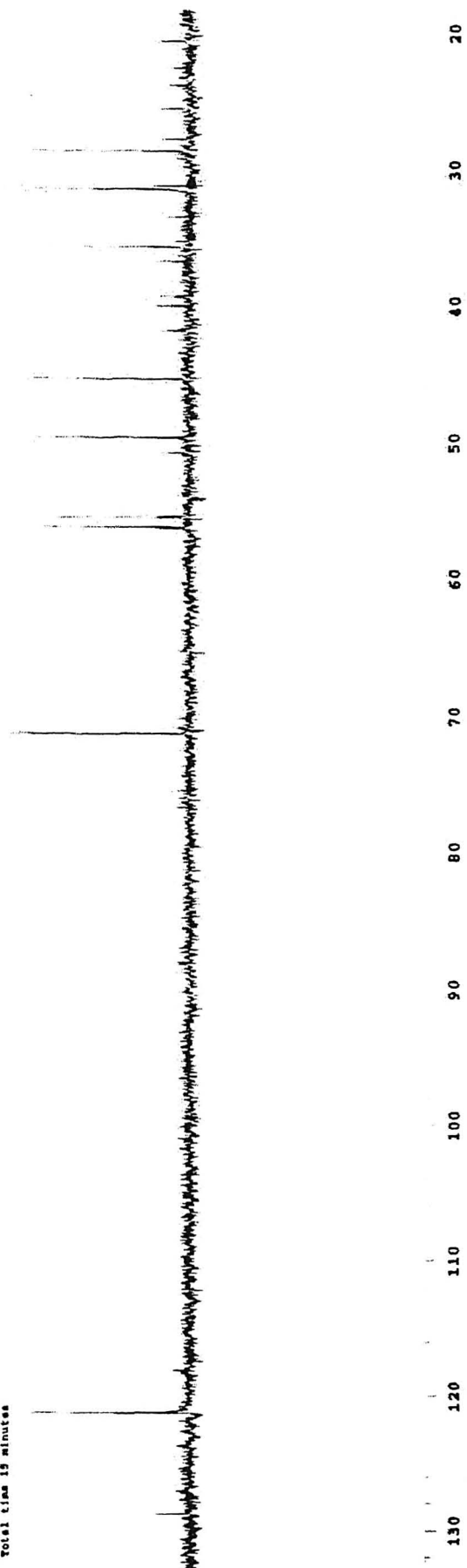


Espectro 12 – DEPT 135 DE 4D1 (sitosterol)

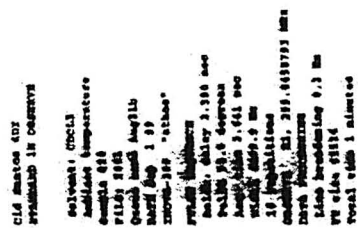


Espectro 13 – DEPT 90 DE 4D1 (sitosterol)

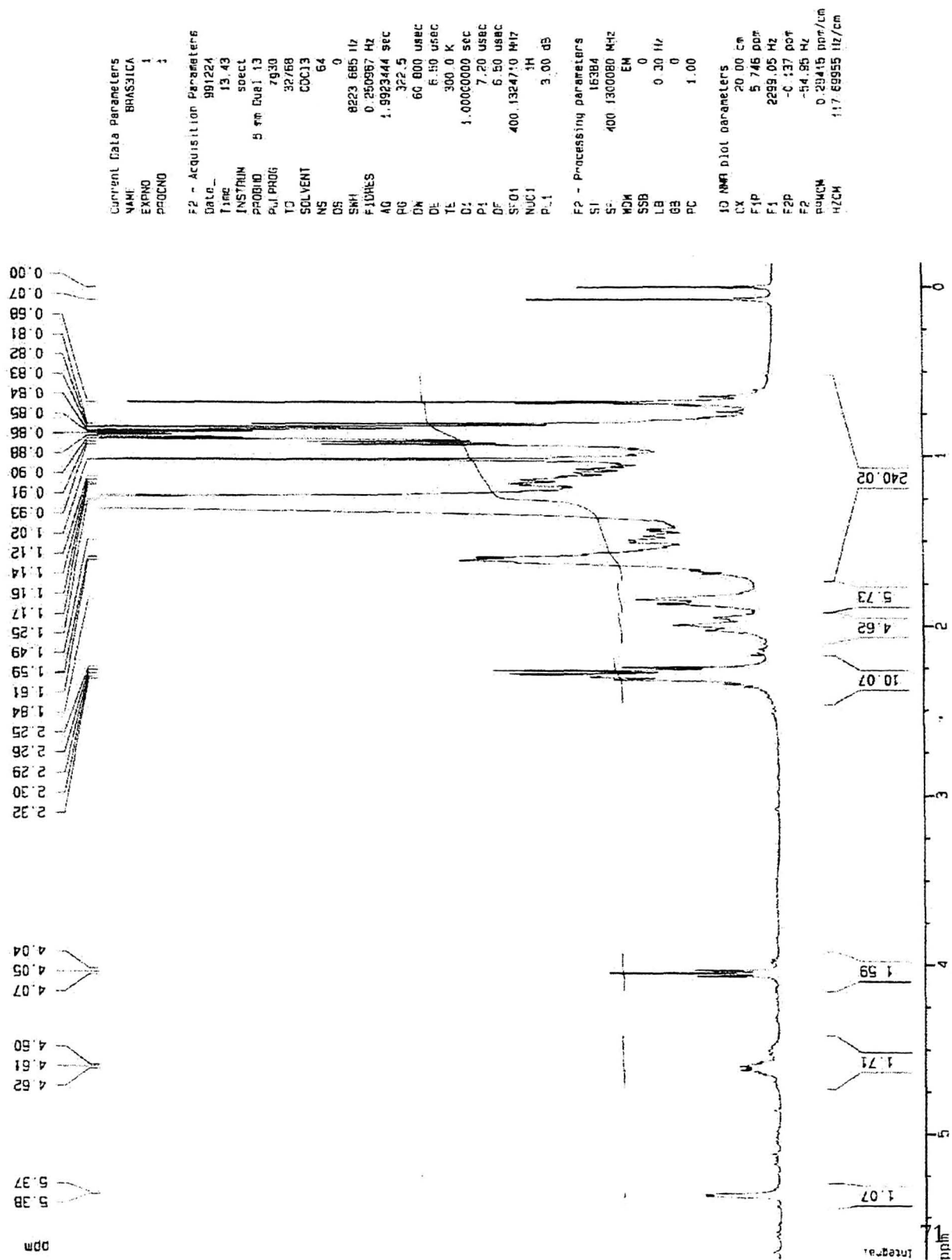
Solvent: CDCl₃
 Ambient temperature
 Sample: 83
 File: J02
 Date Sep 11 99
 INOVA-300 "ethos"
 PULP SEQUENCE: dept
 Relax. Delay 2.000 sec
 Pulse 90.0 degree
 Acq. time 1.618 sec
 Width 20000.0 Hz
 256 repetitions
 OBSERVE C13, 75.396141 MHz
 DECOUPLE H1, 399.647745 MHz
 Power 40 dB
 on during acquisition
 off during delay
 MATR-16 modulated
 DATA PROCESSING
 Line broadening 1.0 Hz
 FT size 45316
 Total time 19 minutes



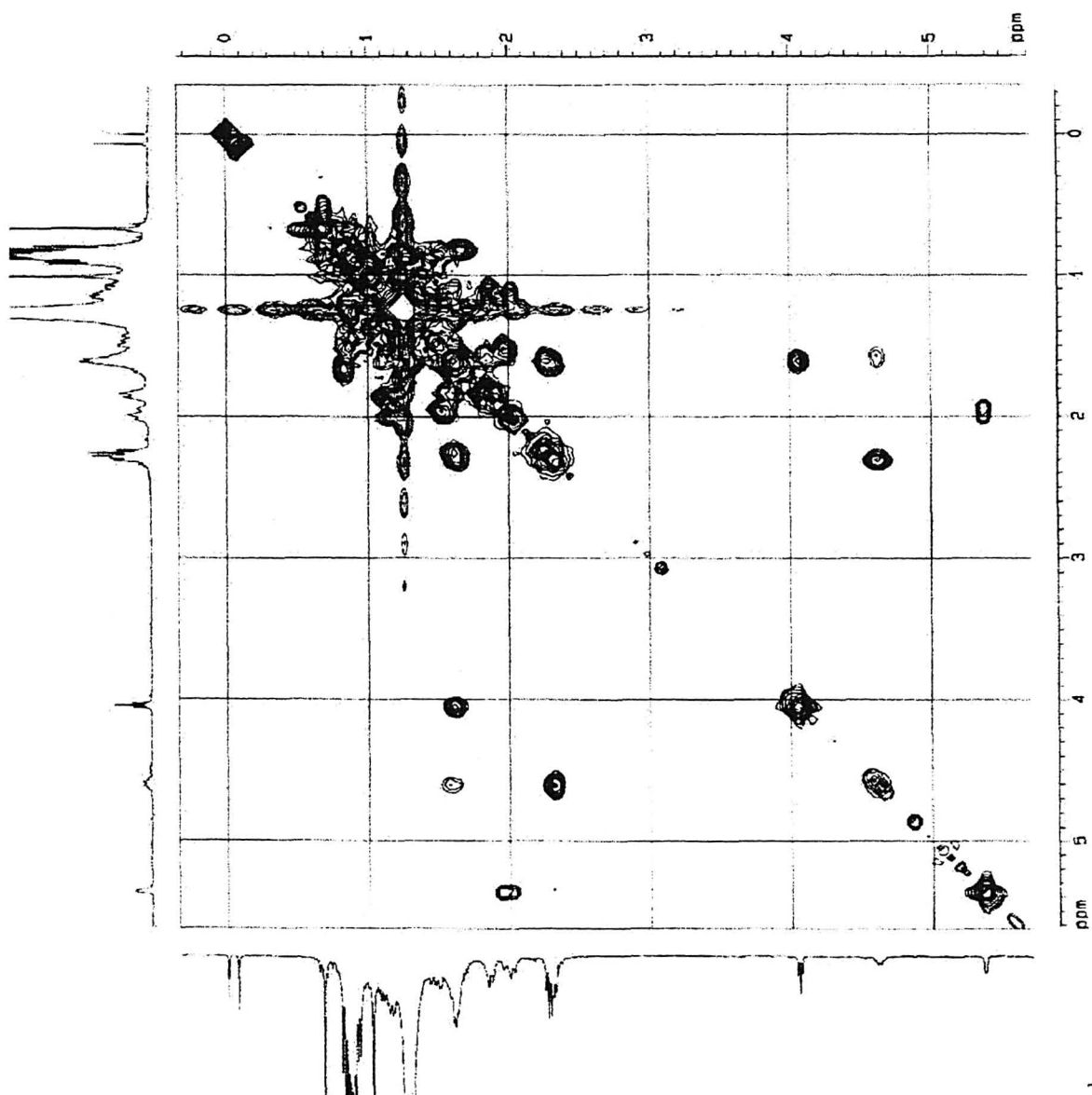
Espectro 14 - RMN ^1H de 4D1 (sitosterol)



Espectro 15 – RMN ¹H de 3IC

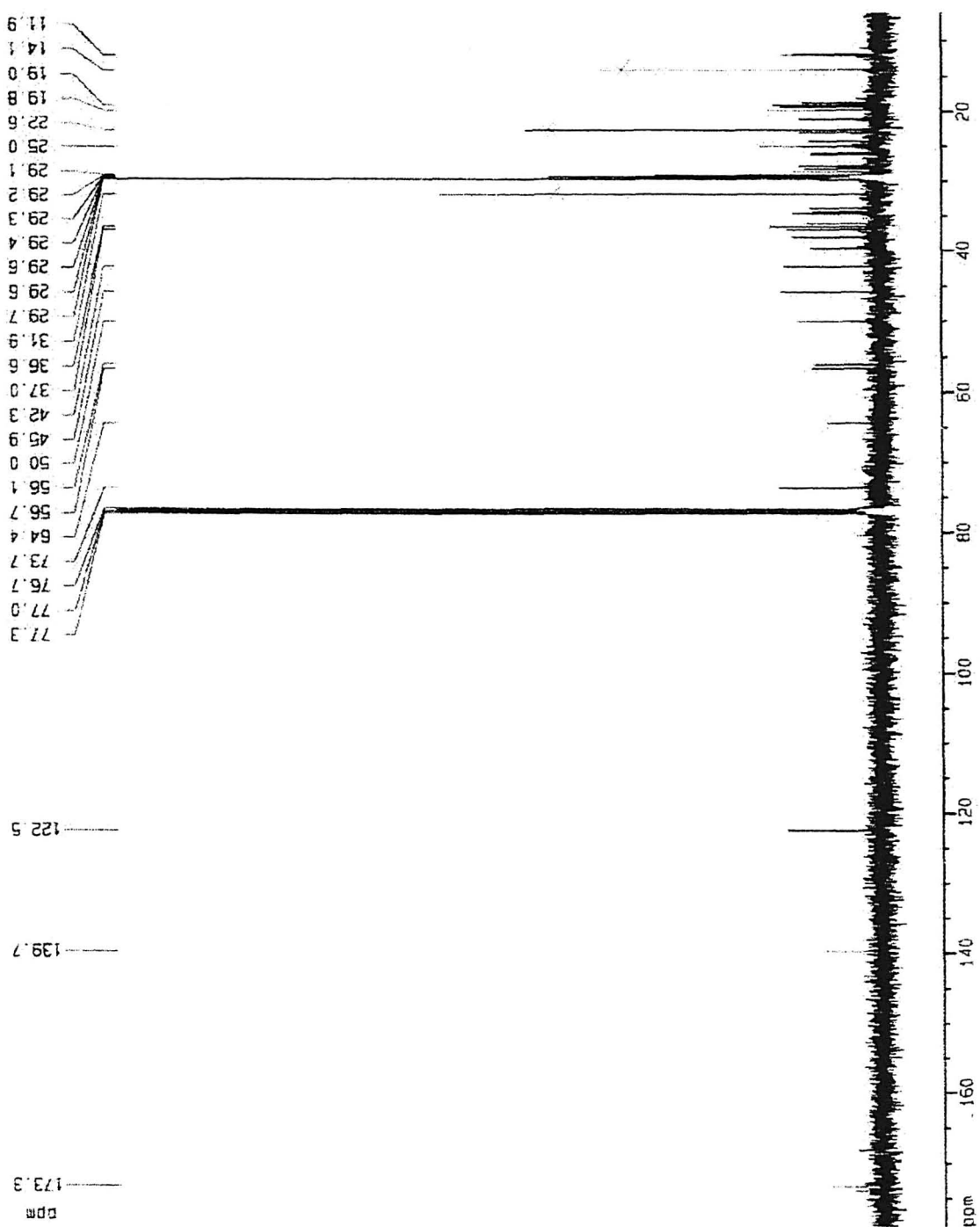


COSY HOMOSPOIL
COSYGAPX

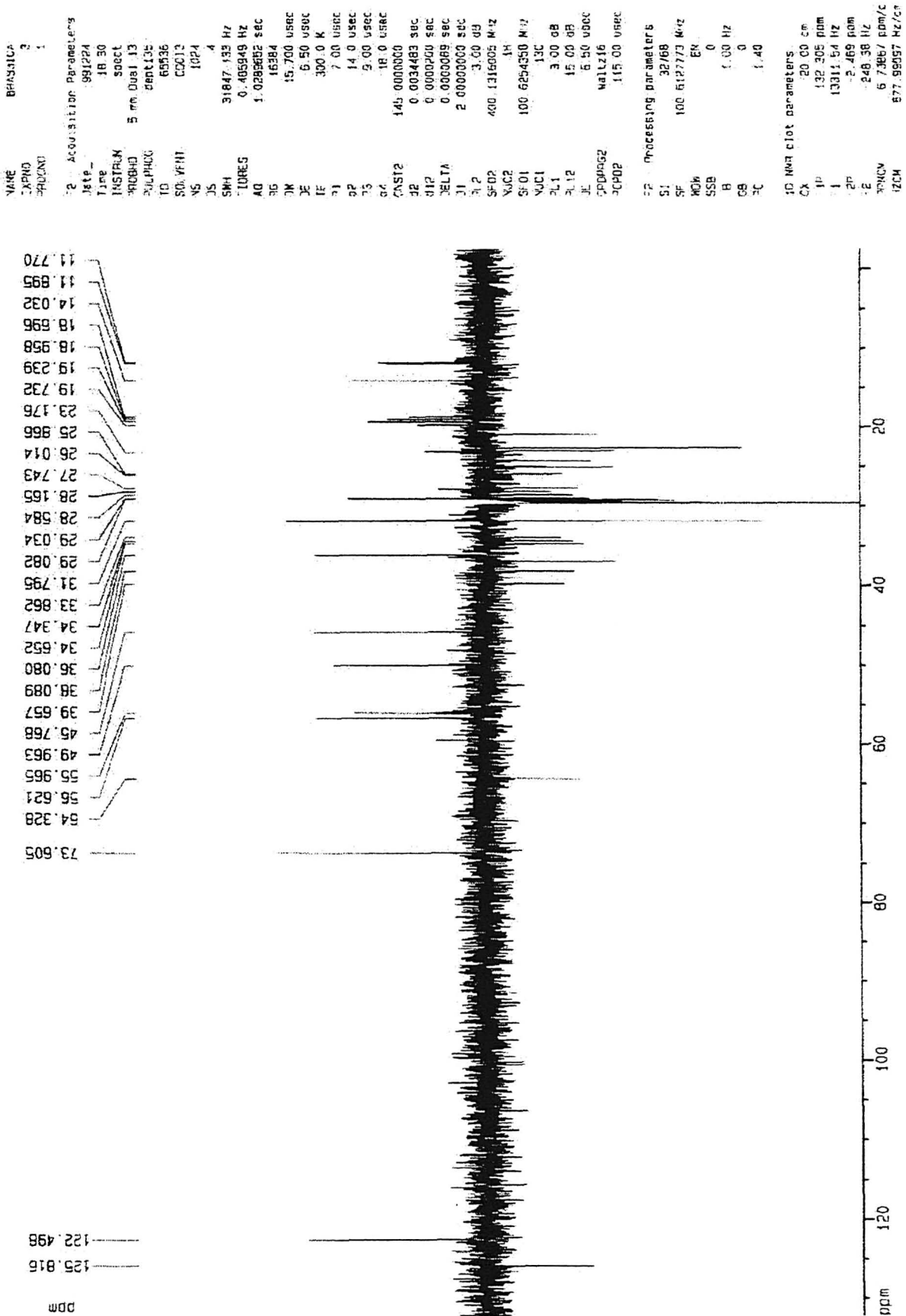
[illegible]

Espectro 17 – RMN ¹³C desacoplado 3IC

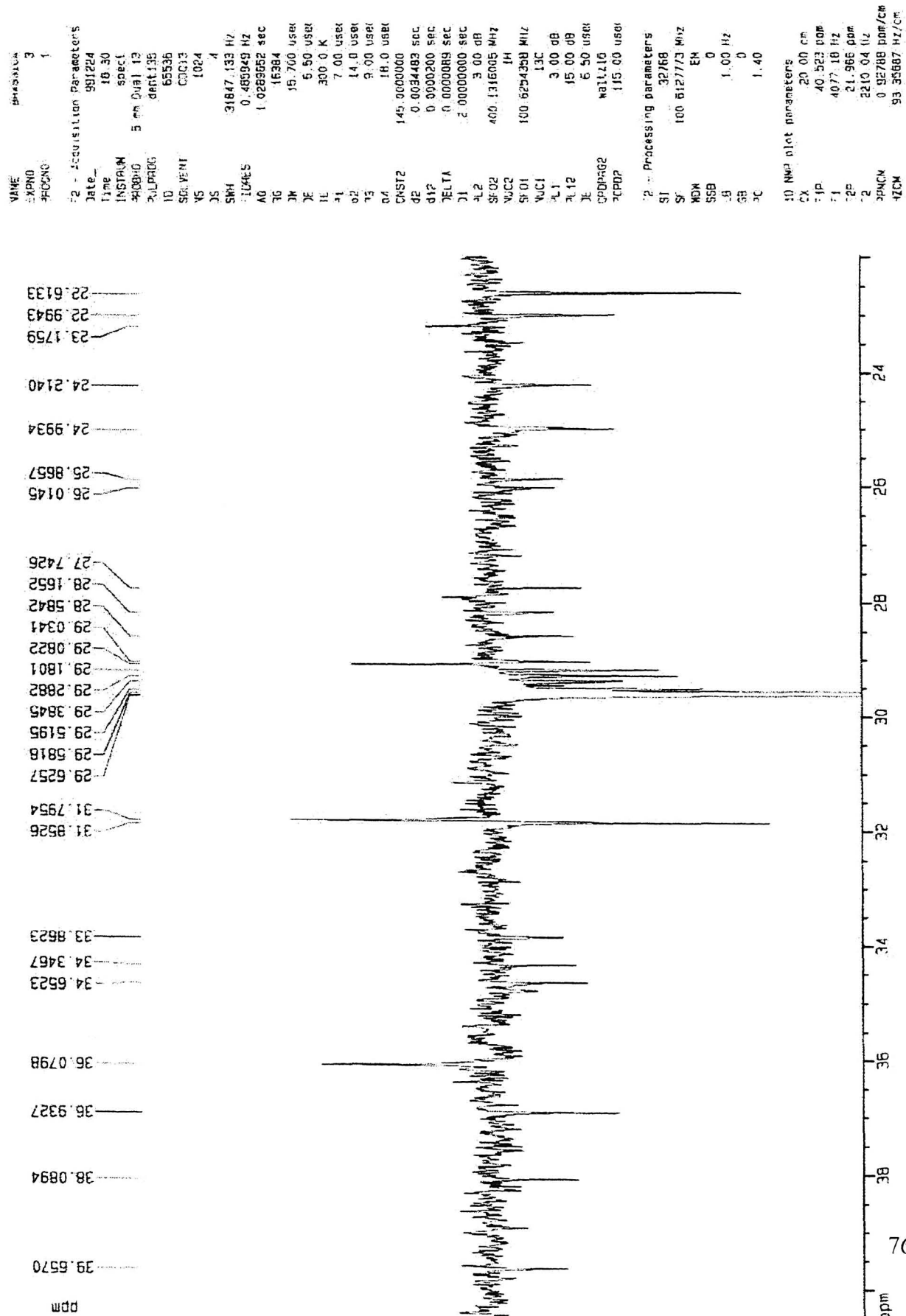
Current Data Parameters
 NAME BRAS3ICA
 EXPNO 2
 PROCNO 1
 F2 - Acquisition Parameters
 Date 991224
 Time 17 37
 INSTRUM spect
 PROBN 5 mm Dui 13
 PULPROG zgpg30
 TO 65536
 SOLVENT CDCl₃
 NS 3072
 DS 2
 SWH 31047.133 Hz
 FIDRES 0.485949 Hz
 AQ 1.0289653 sec
 RG 32768
 DN 15.700 usec
 DE 6.50 usec
 TE 300.0 K
 d11 0.030000 sec
 d12 0.000200 sec
 PL1 15.00 dB
 PL2 3.00 dB
 PL3 15.00 dB
 PL4 7.00 usec
 DE 6.50 usec
 SF 100.6254358 MHz
 NUC1 13C
 PL1 3.00 dB
 F2 - Processing parameters
 SI 32768
 SF 100.6127718 MHz
 RG 1
 EX 0
 SS 0
 LH 1.00 Hz
 SB 0
 PC 1.40
 1D NMR plot parameters
 CX 20.00 cm
 F1 179.035 ppm
 F2 18013.34 Hz
 F3 5.933 ppm
 F4 596.94 Hz
 RFNCM 8 65516 ppm/cm
 -1/CM 810 82007 Hz/cm



Espectro 18 - DEPT 135 de 3IC



Espectro 19 – Expansão do DEPT 135 de 3IC



3 ANÁLISE DO ÁCIDO BETULÍNICO POR CLAE EM *Doliocarpus schottianus*

3.1 Introdução

O uso de CLAE para a análise de extratos vegetais tem aumentado consideravelmente nos últimos anos. Várias classes de compostos naturais podem ser analisadas utilizando um detetor apropriado (REHWALD et al. 1994). Dentre estes compostos estão os triterpenóides (UGAZ, 1994).

A obtenção de um cromatograma do extrato bruto de uma planta em condições padronizadas (impressão digital ou “fingerprint”), que pode ser muito útil para o controle de qualidade de fitoterápicos. Esta técnica possui vantagens importantes em relação a CCD, que é mais utilizada devido ao baixo custo.

Poucos relatos foram encontrados relativos à quantificação de triterpenóides em plantas. Dois deles (GÜNTHER & WAGNER, 1996 e VERMA, 1999) descrevem a análise destes compostos em extratos e fitopreparados de *Centella asiatica*. Outro relata a quantificação de oleanenos em feijões disponíveis comercialmente (KINJO, 1998). Entretanto, nenhum trabalho foi encontrado de análise quantitativa por CLAE de metabólitos secundários presentes em plantas da família Dilleniaceae.

Sobre o doseamento do ácido betulínico foram encontrados dois trabalhos. Em um deles, foi determinada a concentração em tecidos animais por CLAE-EM (SHIN et al. 1999). Em outro foi utilizada CCD para o doseamento em *Zizyphus vulgaris* (SY, 1986).

3.2 Experimental

3.2.1 Instrumentação

Foi utilizado um sistema da marca Varian constituído de bomba quaternária modelo 9012Q; detetor de foto diodo modelo 9065; injetor automático marca Rainin modelo AI-200; estação de trabalho Star versão 5.3. A coluna cromatográfica da marca Rainin foi C18 de 5 μ m, 4,5x250 mm.

3.2.2 Preparo da amostra

3.2.2.1 Extração

O material vegetal (cerca de 0,500 g para caule inteiro e casca e cerca de 2,000 g para folhas e lenho), seco e triturado, foi submetido à extração por três metodologias diferentes.

A amostra por extrator Soxhlet foi preparada acondicionado-se o material em cartucho de papel de filtro e mantido em refluxo por quatro horas, utilizando CHCl_3 .

A extração por banho de ultra-som com CHCl_3 foi realizada extraíndo-se seis vezes por quinze minutos em banho de ultra-som. A sétima extração não apresentou sinal de ácido betulínico ao ser avaliada por CCD.

A extração de excolha, utilizando acetato de etila com foi realizada em três extrações por quinze minutos em banho de ultra-som. Uma quarta extração não revelou presença de ácido betulínico (CCD).

3.2.2.2 Purificação

Os extratos resultantes foram então reunidos, evaporados, solubilizados em 4 mL de CHCl_3 e filtrado em uma coluna de sílica 60 (300mg). A coluna foi percolada com o mesmo solvente e o eluato evaporado. O resíduo foi redissolvido em metanol e passado por uma coluna de sílica C-18 (200mg) previamente condicionada. O volume do eluato foi completado para 10 mL em balão volumétrico e a amostra analisada por CLAE.

3.2.3 Condições cromatográficas

A fase móvel utilizada foi uma mistura de acetonitrila e água (com pH ajustado para 3,0 com ácido ortofosfórico), na proporção de 9:1. A separação foi realizada com um fluxo de 1,00 mL/min e coluna à temperatura ambiente. O volume de injeção foi de 30 μL e a detecção foi realizada em 210 nm.

3.2.4 Determinação e calibração

A determinação do ácido betulínico foi realizada utilizando o método de padrão externo. A curva de calibração (Figura 20) foi obtida com soluções-padrão em três diferentes concentrações: 50, 100 e 150 mgL^{-1} . O coeficiente de correlação encontrado para o ácido betulínico foi de 0,995139.

Figura 20 - Curva de calibração do ácido betulínico*

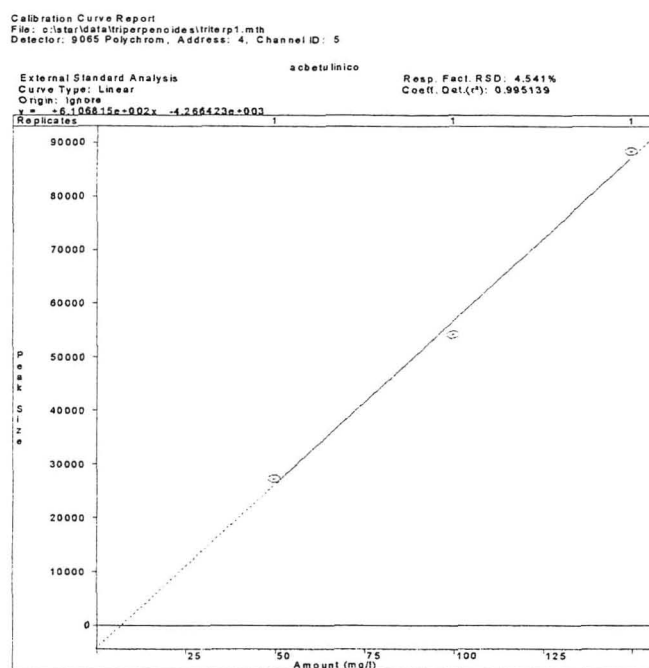
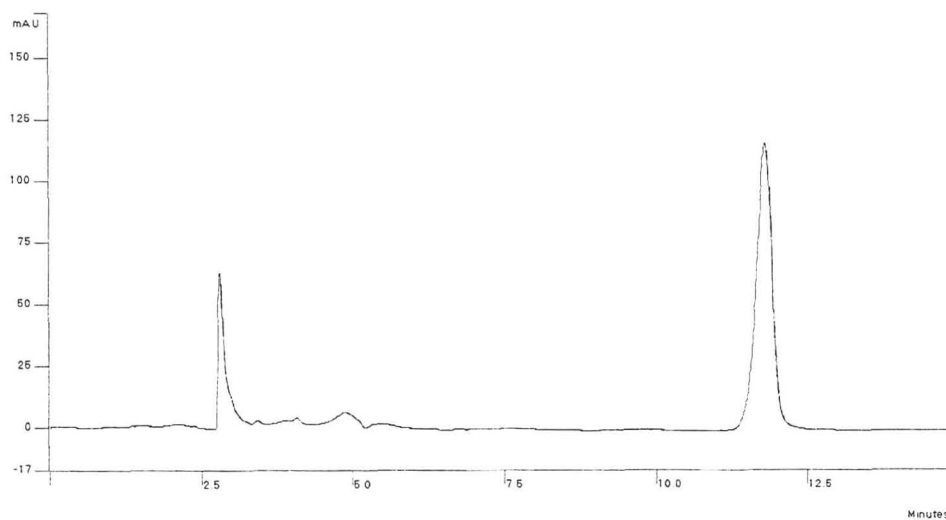


Figura 21 - Cromatograma da solução padrão de ácido betulínico *



* Condições da análise: Fase móvel: acetonitrila e água (pH 3,0), 9:1. Fluxo: 1,00 mL/min
 Coluna C-18. Injeção 30 µL Detecção em 210 nm.

3.3 Resultados e discussão

A preparação da amostra é um dos passos mais importantes na análise por CLAE, especialmente nos casos de matrizes complexas como os materiais vegetais. Essa preparação pode ser resumida em duas fases: extração, onde o analito vai ser retirado do material vegetal; limpeza, onde as impurezas da matriz são removidas.

A primeira etapa, de extração, é comumente feita em modo contínuo em aparelho Soxhlet. Apesar de eficiente, apresenta o inconveniente de ser demorada e de submeter o material vegetal à temperatura de ebulição do solvente por um tempo que pode ser prolongado. A extração utilizando ultra-som é uma alternativa interessante pois pode ser mais rápida suave, desde que o analito possa ser extraído convenientemente com um solvente adequado. Além disso, nesse caso a amostra pode ser extraída à temperatura ambiente. Outros métodos modernos de extração com fluidos supercríticos estão sendo cada vez mais empregados; a grande desvantagem é a necessidade de equipamento próprio e dispendioso.

A segunda etapa, ou seja a de limpeza, depende do tipo de material a ser analisado. O método hoje mais utilizando é o de extração em fase sólida. Ele consiste na passagem do extrato por uma mini-coluna contendo uma fase estacionária do mesmo tipo da que será utilizada na coluna. Utilizando um eluente adequado pode-se remover o analito da coluna de modo que substâncias que se liguem irreversivelmente fiquem retidas.

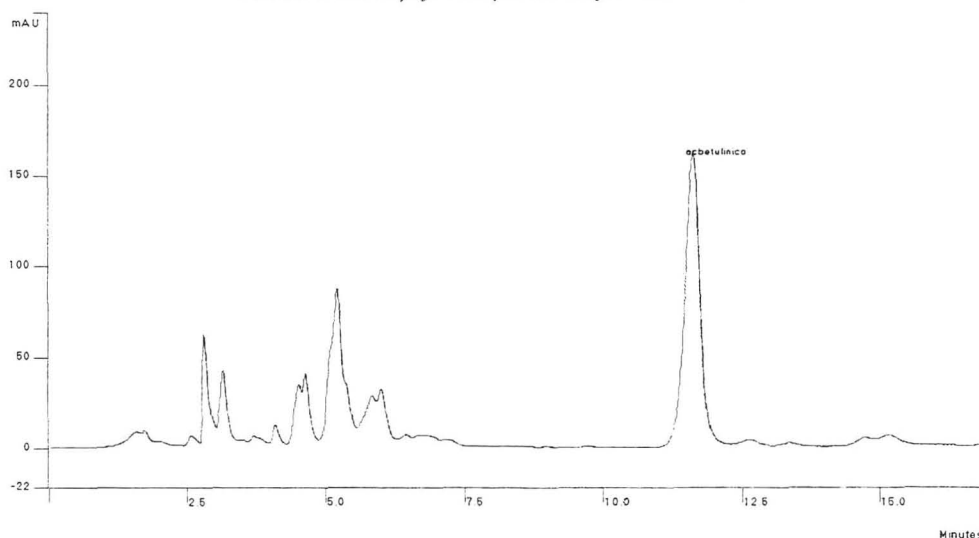
O material botânico seco e triturado, foi extraído com acetato de etila em banho de ultra-som. Este método mostrou-se mais eficiente do que a extração utilizando aparelho Soxhlet, onde era necessário um

tempo superior a quatro horas. Após a extração a solução foi filtrada, concentrada e redissolvida em clorofórmio. O extrato assim obtido foi filtrado em sílica gel, para a retirada de material muito polar. Após evaporação do solvente e ressolubilização em metanol a solução é passada por sílica de fase reversa C-18.

Utilizando as condições descritas obteve-se uma boa resolução do pico do ácido betulínico ($t_r = 11,5$ minutos) (Figura 22). Foi obtida uma resolução a nível de linha de base, essencial para a uma quantificação precisa.

Figura 22 - Cromatograma de extrato de *Doliocarpus schottianus**

* **Condições da análise:** Fase móvel: acetonitrila e água (pH 3,0), 9:1. Fluxo: 1,00 mL/min
Coluna C-18. Injeção 30 μ L Detecção em 210 nm.



Inicialmente foi feita uma comparação de três procedimentos de extração, cujos resultados estão resumidos na Tabela 9. O método com Soxhlet foi muito demorado, acima de quatro horas e a extração por ultra-som com clorofórmio precisava ser repetida mais de sete vezes antes que ele apresentasse resultado negativo frente à CCD. Dos três

métodos aquele utilizando acetato de etila em banho de ultra-som foi o que produziu o melhor rendimento.

Tabela 9 –Metodologia de extração

Nome da amostra	Quantidade utilizada	Concentração (mg%)
Soxhlet CHCl ₃	0,508	128,70
Ultrasom CHCl ₃	0,514	176,24
Ultra-som acetato	0,507	186,38

Trabalhou-se também com replicatas e padrão interno para se verificar a confiabilidade do método. As três amostras em replicatas foram preparadas de forma idêntica à descrita no item 3.2.2, obtendo-se os valores apresentados na Tabela 10. A média para eles é de 167,13 e o desvio padrão apresentou um valor de $\pm 8,06\%$. Para o teste com padrão interno foi acrescentado à amostra

Tabela 10 – Replicatas do ácido betulínico

Amostra	Concentração (mg%)
1	181,78
2	167,42
3	152,18

Os resultados iniciais do teor do ácido betulínico no caule total da planta foram discrepantes. Observou-se que caules de diferentes diâmetros produziam resultados muito diferentes. Isto poderia ser explicado pela idade do vegetal. O teor de um metabólito pode variar com o grau de desenvolvimento da planta. Outra hipótese era de que o ácido betulínico poderia estar distribuído não uniformemente entre casca do caule e lenho.

Resolveu-se, então, quantificar o metabólito no lenho e na casca do lenho, separadamente. Os resultados estão resumidos na Tabela 11. O

caule B, por ter diâmetro maior ao de A, produziu teor menor. Entretanto, ao se fazer a quantificação na casca de B obteve-se um valor consideravelmente alto. Isto pode ser explicado pelo fato de que, apesar de ter um alto teor na casca, ao se fazer a quantificação no caule total (com casca) a proporção de lenho é muito maior do que da casca em relação a um caule mais fino.

Além disso, os teores na casca também variam de acordo com a idade da planta. Comparando-se os valores da casca B e C conclui-se que, pelo fato de B ter um diâmetro maior e portanto, maior tempo de desenvolvimento, ocorreu maior acúmulo do ácido betulínico na casca. A determinação do metabólito nas folhas revelou um valor muito inferior ao da casca e lenho.

Os resultados mostraram, portanto, que o ácido betulínico se acumula na casca da planta, o que explica os diferentes teores obtidos em caules totais de diâmetros diferentes.

Tabela 11 – Doseamento do ácido betulínico

Amostra	Concentração (mg%)
Caule A (3,54mm)	65,7
Caule B (27,70mm)	53,4
Casca B	2.059,5
Casca C (12,02mm)	179,1
Folha B	16,6

3.4 Conclusão

Utilizando CLAE foi desenvolvida uma metodologia de quantificação de ácido betulínico em *D. schottianus*. Por essa metodologia chegou-se a conclusão que o ácido betulínico se acumula na casca da planta. As folhas não apresentam quantidades significativas do mesmo. Esta metodologia pode ser útil para o doseamento do composto em estudos biológicos e para sua determinação em outras plantas.

4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGRAWAL, P. K.; JAIN, D. C.; GUPTA, R. K.; THAKUR, R. S. Carbon-13 NMR spectroscopy of steroidal sapogenins and steroidal saponins. **Phytochemistry**. 1985 v. 24 (11) p. 2479-2496
- ALMEIDA JUNIOR, J., X. Estudo fitoquímico de *Piper tuberculum*. **Disertação de Mestrado**; Universidade Federal da Paraíba; João Pessoa, 1996.
- AMES, T. R.; HALSALL, T. G.; JONES, E. R. H. Chemistry of the triterpenes. VII. An interrelationship between the lupeol and β -amyrin series. Elucidation of the structure of lupeol. **Journal of Chemical Society**. 1951 p. 450
- BRINGMANN, G.; SAEB, W.; ASSI, L. A.; FRANCOIS, G.; NARAYANAN, A. S. S.; Betulinic acid: isolation from *Triphyllum peltatum* and *Ancistrocladus heyneanus*, antimalarial activity, and crystal structure of the benzyl ester. **Planta Medica**. 1997 v. 63(3) p. 255-257
- BUDZIKIEWICZ, H.; WILSON, J.M.; DJERASSI, C. Mass spectrometry in structural and stereochemical problems. XXXII. Pentacyclic triterpenes. **Journal of American Chemical Society**. 1963 v. 85 p. 3688

- BRUNETON, J. **Elementos de fitoquímica y de farmacognosia.**
Zaragoza, Editorial Acribia, 1991.
- CAETANO, N. N.; DUARTE, M. R.; SANTOS, C. A. M.
Farmacognosia prática. v.1 Depto. Farmácia, UFPR: Curitiba,
1996
- CRONQUIST, A On the taxonomic significance of secondary
metabolites in angiosperms in: **Flowering Plants, Symp.** Viena,
Springer, 1976
- _____. **An integrated System of classification of flowering
plants.** New York: Columbia University Press, 1987.
- DEWICK, P. **Medicinal natural products – A biosynthetic
approach.** New York: John Wiley & Sons, 1997
- DOMINGUEZ, X. A. **Métodos de investigación fitoquímica.**
México: Editorial Limusa, 1973.
- ELIEL, E. L.; ALLINGER, N. A.; ANGYAL, S. J.; MORRISON, G. A.
Conformational analysis. New York, Interscience, 1965
- EVANS, W. C. **Trease and Evans–Pharmacognosy.** 14 ed. London:
Sauders, 1996
- EVERS, M.; POUJADE, C.; SOLER, F.; RIBEILL, Y.; JAMES, C.;
LELIÈVRE, Y.; GUEGUEN, J.C.; REISDORF, D.; MORIZE, I.;
PAUWELS, R.; DE CLERCQ, E.; HÉNIN, Y.; BOUSSEAU, A.;

- MAYAUX, J.F.; LE PECQ, J. B.; DEREU, N.. Betulinic acid derivatives: a new class of human immunodeficiency virus type 1 specific inhibitors with a new mode of action. **Journal of medicinal chemistry**. 1996. v. 39(5) pag. 1056-1068
- FUJIOKA, T.; KASHIWADA, Y.; KILKUSKIE, R. E; COSENTINO, L. M.; BALLAS, L. M.; JIANG, J.B.; JANZEN, W. P.; CHEN, I. S.; LEE, K. H. Anti-AIDS agents, 11. Betulinic acid and platanic acid as anti-HIV principles from *Syzigium claviflorum*, and the anti-HIV activity of structurally related triterpenoids. **Journal of Natural Products**. 1994 v. 57(2) p. 243-247
- FULDA, S.; FRIESEN, C.; LOS, M.; SCAFFIDI, C.; MIER, W.; BENEDICT, M.; NUÑEZ, G.; KRAMMER, P. H.; PETER, M. E.; DEBATIN, K. M. Betulinic acid triggers CD95 (APO-1/Faz) and p53-independent apoptosis via activation of caspases in neurodermal tumors. **Cancer Research** 1997 v. 57(21) p. 4956-4964
- GALLEGOS, R. S. Metodologia para identificação dos componentes de misturas de triterpenos por RMN de ^{13}C . **Tese de Doutorado**; Universidade de São Paulo; Instituto de Química, São Paulo, 1990.
- ____; ____; ROQUE, N. F. Análise de misturas de triterpenos por RMN de ^{13}C . **Química Nova**. 1991 v.13 (4) p.278-281
- GÜNTHER, B; WAGNER, H. Quantitative determination of triterpenes in extracts and phytopreparations of *Centella asiatica* (L.) Urban. **Phytomedicine**. 1996 v.3 (1) p. 59-65

GURNI, A.; KÖNIG, W. A.; KUBITZKI, K. Flavonoid glycosides and sulphates from the Dilleniaceae. **Phytochemistry**. 1981 v.20 (5) p.1057-1059

_____, ____; KUBITZKI, K Flavonoid chemistry and systematics of the Dilleniaceae. **Biochem. Syst. Ecol.** 1981 v. 9 (2-3) p. 109-114 b

HARBORNE, J. B. Biochemical systematics. The use of chemistry in plant classification. **Progress. Phytochem.** 1968 v. 1 p. 548-588.

_____, ____ **Introduction to Ecological biochemistry**. 4ed. San Diego, Academic Press, 1993

HILLER, N. V.; THI, G.; LEHMANN; GRÜNDEMANN, E. Betulinsäure – ein sapogenin in *Eryngium bromeliifolium* Delar. **Pharmazie**. 1974 v.29(54) p.148-149

JOLY, A. B. **Introdução à taxonomia vegetal**. 7ed. São Paulo, Biblioteca Universitária, 1985.

KUBITZKI, K. Flavonoids and systematics of the Dilleniaceae. **Ber. Deut. Bot. Ges.** 1968. v 81 (6) p. 238-251

LICHTENTHALER, H. K.; ROHMER, M.; SCHWENDER, J. Two independent biochemical pathways for isopentenyl diphosphate and isoprenoid biosynthesis in higher plants. **Physiol. Plant** 1997 v.101 p. 643-652

_____, ____; ROHMER, M.; DISCH, J. SCHWENDER, J.
Biosynthesis of isoprenoid in higher plants chloroplasts proceeds via
a mavalonate-independent pathways **FEBS Letters**1997 v.400
p.271-274

MABBERLEY, D. J. The plant book – **A portable dictionary of the
higher plants**. Avon, Cambridge Press, 1981

MAHATO, S.B.; NANDY, A. K.; ROY, G. Triterpenoids.
Phytochemistry. 1992 v.31 p.2199-2249.

_____, ____; KUNDU, A. P. ¹³C-NMR spectra of pentacyclic
triterpenoid – a compilation and some salient features.
Phytochemistry. 1994 v.37 (6) p.1517-1575

_____, ____; SEN, S. Advances in triterpenoid research 1990-1994.
Phytochemistry. 1997. v. 44 (7) p. 1185-1236

MANN, J. **Natural products – Their chemistry and Biological
significance**. Essex, Longman Scientific & Technical, 1995.

MARKHAM, K. R. **Techniques of flavonoid identification**. London,
Academic Press, 1982.

MARLES, R. J.; FARNSWORTH, N. R. Antidiabetic plants and their
active constituents. **Phytomedicine**. 1995 v.2(2), p.137-189

MARTIUS, K. P.; EICHLER, A. G.; URBAN, I. **Flora Brasiliensis**. 13v.
I 74 1841-1874

MEISELS, A.; JEGER, O.; RUZICKA, L. Triterpenes (CXXXXIX)
Constitution of α amyrin and its relation to β -amyrin. **Helv. Chim.
Acta.** 1949 v. 32 p. 1075

MELZIG, M.F.; BORMANN, H. Betulinic acid inhibits aminopeptidase
N activity. **Planta Medica.** 1998 v. 64 (7) p.655-657

NICK, A.; WRIGHT, A. D.; STICHER, O. Antibacterial triterpenoid
acids from *Dillenia papuana*. **Journal of Natural Products.** 1994 v.
57 (9) p.1245-1250.

_____, ____; WRIGHT, A. D.; RALI, T.; STICHER, O. Antibacterial
triterpenoids from *Dillenia papuana* and their structure-activity
relationships. **Phytochemistry.** 1995 v. 40 (6) p. 1691-1695.

Novel natural composition for the treatment of melanomas – University
of Illinois at Chicago Intellectual Property Office:
<http://www.uic.edu/depts/ovcr/ipo/cn43.html> 18/02/1999

PISHA, E; CHAI, H.; LEE, I. S.; CHAGWEDERA, T. E.;
FARNSWORTH, N. R.; CORDELL, G. A.; BEECHER, C. W.;
FONG, H. H.; KINGHORN, A. D.; BROWN, D. M. Discovery of
betulinic acid as a selective inhibitor of human melanoma that
functions by induction of apoptosis. **Natural medicine.** 1995 v.
1(10) p. 1046-1051

REHWALD, A.; MEIER, B.; STICHER, O. Qualitative and quantitative
reversed-phase chromatography of flavonoids in Crataegus leaves

and flowers. **Journal of Chromatography A**, v. 667, pp. 25-33, 1994.

ROBBERS, E.; SPEEDIE, M. K.; TYLER, V. E. **Farmacognosia e farmacobiotechnologia**. São Paulo, Premier, 1997. p.168-174

ROHMER, M.; KNANI, M.; SIMONIN, P.; SUTTER, B.; SAHM, H. Isoprenoid biosynthesis in bacteria: a novel pathway for the early steps leading to isopentenyl di phosphate. **Biochem. J.** 1993. V. 295 p. 517-524.

ROHMER, M.; SEEMANN, M; HORBACH, S.; BRINGER-MEYER, S.; SAHM, H. Glyceraldehyde 3-phosphate and pyruvate as precursors of isoprenic units in na alternative non-mevalonate pathway for terpenoids biosynthesis. **J. Am. Chem. Soc.** 1996. V. 118 p. 2564-2566.

SAUVAIN, M.; KUNESCH, N.; POISSON, J.; GANTIER, J. C.; GAYRAL, P.; DEDET, J. P. Isolation of leishmanicidal triterpenes and lignans from the Amazonian Liana *Doliocarpus dentatus*. **Phytother. Res.** 1996, v.10(1), p1-4

SAFAYHI, H.; SAILER, E.R. Antinflammatory actions of pentacyclic triterpenes. **Planta Medica.** 1997. v.63 p. 487-493.

SCHMIDT, M.L. Betulinic acid induces apoptosis in human neuroblastoma cell lines. **Eur. J. Cancer.** 1997 v. 33(12) 2007-2010

SHIN, Y.G.; C.H.O, K.H.; CHUNG, S. M.; GRAHAM, J.; DAS GUPTA; T.K.; PEZZUTO, J.M.. Determination of betulinic acid in mouse blood, tumor and tissue homogenates by liquid chromatography-electrospray mass spectrometry. **Journal of Chromatography B**. 1999, v.732(2); p. 331-336

SY, L. Quantitative determination of betulinic acid in *Zizyphus vulgaris* by TLC-colorimetry. **Chung Yao Tung Pao**. 1986, v.11(11) p. 43-5

STAHL, E.; DUMONT,E.; JORK, H.; KRAUS, L.; ROZUMEK, K-E.; SCHORN, P-J. **Analyse chromatographique et microscopique des drogues - Manuel pratique pour les Pharmacopées Européennes**. Paris: Enterprise, 1975.

STEELE, J.C. WARHURST D.C.; KIRBY G.C.; SIMMONDS M. S. In vitro and in vivo evaluation of betulinic acid as na antimalarial. **Phytother. Res**. 1999, v.13(2), p. 115-119

SUN, H. H.; KAPLITA, P. V.; HOUCK, D. R.; STAWICKI, M. B. MCGARRY, R.; WAHL, R. C.; GILLUM, A. M.; COOPER, R. A metalloproteinase inhibitor from *Doliocarpus verruculosus*. **Phytochemistry**. 1996, v. 10(3), p.194-197

UGAZ, O. L. **Investigación fitoquímica – Métodos en el estudio de productos naturales**. 2ed. Lima, Pontificia Universidad Catolica del Peru, 1994.

UICNews:<http://www.uic.edu/depts/paff/uicnews/arc.../uicnews9503-22/50524025.html> 18/02/1999

VLIETNICK, A. J.; DE BRUYNE, S. A.; PIETERS, L. A. Plant-derived leading compounds for chemoteraphy of human immunodeficiency virus (HIV) infection. **Planta Medica**. 1998 v.64 p. 97-109

TATCHELL, A.. R. **Vogel's textbook of pratical Organic Chemistry**. 5 ed. New York, Longman, 1989

YASUKAWA, K; TAKIDO, M.; MATSUMOTO, T.; TAKEUCHI, M.; NAKAGAWA, S. Sterol and triterpenes derivatives from plants inhibit the effects of a tumor promoter, and sitosterol and betulinic acid inhibit tumor formation in mouse skin two-stage. **Oncology**. 1991. v. 48(1) p. 72-76